
BACHELORARBEIT

Frau
Katja Herold

Etablierung einer HPLC- Nachweismethode von Glyphosat in Futtermitteln und Urinproben

Mittweida, 2012

Fakultät Mathematik, Naturwissenschaften,
Informatik

BACHELORARBEIT

Etablierung einer HPLC- Nachweismethode von Glyphosat in Futtermitteln und Urinproben

Autor:
Frau

Katja Herold

Studiengang:
Biotechnologie/ Bioinformatik

Seminargruppe:
BI09w3-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Dr. rer. nat. Katrin Anhalt

Einreichung:
Mittweida, 08.Oktober.2012

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2012

Bibliographische Beschreibung:

Herold, Katja: Etablierung einer HPLC-Nachweismethode von Glyphosat in Futtermitteln und Urinproben. - 2012. – 91 Seiten: davon 15 Seiten Verzeichnisse, 58 Seiten Text, 13 Seiten Anhang Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Bachelorarbeit, 2012

Englischer Titel

Establishment of a HPLC detection method of glyphosate in feed and urine samples

Kurzbeschreibung:

Zum Nachweis von Rückständen des Herbizides Glyphosat in Futtermitteln und Urinproben wurden in dieser Arbeit verschiedene HPLC-Methoden durchgeführt. Dabei kamen eine Nucleodur C18 Gravity (250 mm, 3µm) und eine Nucleodur C18 Gravity (250 mm, 5µm) Trennsäule zum Einsatz. Wechselnde Laufmittelzusammensetzungen als Gradientenmethoden, aber auch als isokratische Methode, wurden angewendet. Die verwendeten mobilen Phasen setzten sich aus Acetonitril und verdünnter Phosphorsäure bzw. einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer zusammen. Für die Aufarbeitung von Futterproben wurden Ionen-Austauscher Kartuschen der Art Chromabond PS-H⁺/ PS-OH⁻ sowie Chromabond HR-XC der Firma Macherey-Nagel getestet. Auch Strata X-AW und Strata C18 Säulen der Firma Phenomenex kamen zum Einsatz. Ein Proteinfällungsreagenz von ChromSystems wurde zur Vorbereitung von Urinproben eingesetzt.

Die HPLC-Analyse von glyphosathaltigen Standardlösungen ist nun mit stabilen Retentionszeiten möglich, jedoch benötigt die Aufarbeitung von Proben zukünftig weitere Überlegungen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers (Hochschule Mittweida) für die Betreuung meiner Bachelor-Arbeit und Dipl.-Ing. (FH) Sandra Feik (Hochschule Mittweida) für die hilfreichen Hinweise in dieser Zeit bedanken.

Einen recht herzlichen Dank gilt Dr. rer. nat. Andrea Lindner und den Mitarbeitern der BioCheck GmbH, die die Durchführung meiner Bachelorarbeit ermöglicht haben.

Weiterhin möchte ich Dr. Katrin Anhalt danken, die bei manchen schwierigen Problemen während der praktischen Umsetzung die nötigen Denkanstöße parat hatte.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Monika Krüger, Prof. Dr. Herbert Fuhrmann und Gerald Vallentin (Universität Leipzig) für die technische Unterstützung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht schließlich an meine Familie, die immer für mich da ist.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Glyphosat	1
1.1.1 Chemische Eigenschaften	2
1.1.2 Wirkungsweise auf die Flora	3
1.1.3 Verbleib und Abbau in der Umwelt.....	3
1.1.4 Metabolismus.....	5
1.1.5 Toxizität gegenüber der Fauna	5
1.1.6 Symptome bei Tieren und Menschen nach Exposition	6
1.2 Grenzwerte.....	7
1.3 Nachweismethoden von Glyphosat	8
2 Zielstellung	10
3 Material.....	11
3.1 Chemikalien	11
3.2 Material.....	12
3.3 Geräte.....	12
3.4 Probenmaterial	13
4 Methoden	14
4.1 Herstellung der Standardlösungen	14
4.2 Probenaufarbeitung	14
4.2.1 Futtermittel.....	14
4.2.2 Urinproben	16
4.3 Derivatisierung.....	16
4.4 HPLC-Methode.....	17
4.4.1 Gradientenmethode mit einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer	17
4.4.2 Isokratische Methode	18
4.4.3 Gradientenmethode mit einem Phosphorsäure-Laufmittel	19

5	Ergebnisse.....	20
5.1	Gradientenmethode mit einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer	20
5.2	Isokratische Methode	25
5.3	Gradientenmethode mit einem Phosphorsäure-Laufmittel	26
5.4	Probenaufarbeitung	30
5.4.1	Futtermittel.....	30
5.4.2	Urinproben	40
6	Diskussion	44
6.1	Gradientenmethode mit einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer	44
6.2	Isokratische Methode	47
6.3	Gradientenmethode mit einem Phosphorsäure-Laufmittel	47
6.4	Futtermittel.....	50
6.5	Urinproben	53
7	Ausblick	55
8	Zusammenfassung	56
9	Summary.....	58
	Literaturverzeichnis	59
	Anhang.....	63
	Selbstständigkeitserklärung.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ionischen Formen des Glyphosats	2
Abbildung 2: Abbaureaktionen von Glyphosat im Boden.....	4
Abbildung 3: Chemische Reaktion von Glyphosat mit FMOC-Cl.....	9
Abbildung 4: Injektion von Acetonitril; Anlage A; Methode 1; 3 µm Trennsäule	20
Abbildung 5: Injektion von 100 µg/l GlyFMOC; Anlage A; Methode 1; 3 µm Trennsäule	21
Abbildung 6: Injektion von 5 µg/l GlyFMOC; Anlage A; Methode 1; 3 µm Trennsäule	21
Abbildung 7: Injektion von 10 µg/l, 5 µg/l und 0,5 µg/l GlyFMOC, Anlage A; Methode 1; 5 µm Trennsäule	22
Abbildung 8: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC und 14,33 µg/l derivatiserte Glyphosate- Lösung; Anlage A; Methode 1 (KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5; 30 °C Säulentemperatur); 5µm Trennsäule.....	23
Abbildung 9: Injektion von 10 µg/l; Anlage A; Methode 1 (KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5 und pH 4); 5 µm Trennsäule	23
Abbildung 10: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	24
Abbildung 11: Injektion von Wasser (HPLC-grade); Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	24
Abbildung 12: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 2; 5 µm Trennsäule	25
Abbildung 13: Injektion von Laufmittel (70% KH ₂ PO ₄ -Puffer; 30% ACN); Anlage B; Methode 2; 5 µm Trennsäule	26
Abbildung 14: Injektion von Laufmittel (70% KH ₂ PO ₄ -Puffer; 30% ACN); Anlage B; Methode 2; 5 µm Trennsäule	26
Abbildung 15: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3; 5 µm Trennsäule	27
Abbildung 16: Injektion von 2 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3; 5 µm Trennsäule	27

Abbildung 17: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,7 ml/min); 5 µm Trennsäule	28
Abbildung 18: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,6 ml/min); 5 µm Trennsäule	28
Abbildung 19: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	29
Abbildung 20: Injektion von Futtermittel A; Aufarbeitung über Chromabond PS-H ⁺ / PS-OH ⁻ ; Anlage B; Methode 1 (KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	31
Abbildung 21: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	31
Abbildung 22: Injektion von Futtermittel A; Aufarbeitung über Chromabond HR-XC; Anlage B; Methode 1 (KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	32
Abbildung 23: Injektion von Futtermittel B; Aufarbeitung über Chromabond PS-H ⁺ / PS-OH ⁻ ; Anlage B; Methode 1 (KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	32
Abbildung 24: Injektion von Futtermittel B; Aufarbeitung über Chromabond HR-XC; Anlage B; Methode 1 (KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	33
Abbildung 25: Injektion von dotiertem Futter A (40 µg/l) und 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (15 – 57 % ACN im Gradienten, KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule.....	34
Abbildung 26: Injektion von dotiertem Futter A (40 µg/l); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	35
Abbildung 27: Injektion von dotiertem Futter A (40 µg/l, 1:10 verdünnt); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	35
Abbildung 28: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	36
Abbildung 29: Injektion von Futtermittel A; Aufarbeitung über Strata C18; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule	36

Abbildung 30: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW (Eluat eingetrocknet und in 1 M KCL rückgelöst); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule.....	37
Abbildung 31: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata C18 (Eluat eingetrocknet und in 1 M KCL rückgelöst); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule.....	37
Abbildung 32: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata C18 (Eluat eingetrocknet und in 1 M KCL rückgelöst, 1:5 verdünnt); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule	38
Abbildung 33: Injektion von 12,1 µg/l Glyderiv (eingetrocknet, in Ammoniak-Methanol 5:95 rückgelöst, eingetrocknet und in 1M KCL wieder aufgenommen); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	38
Abbildung 34: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata C18 (Elution mit Methanol pH 11,4); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	39
Abbildung 35: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW (Elution mit Methanol pH 11,4); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	39
Abbildung 36: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW (Elution mit Ameisensäure); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	40
Abbildung 37: Injektion von Urin A (ca. 164 µg/l Glyphosat, 1:20 verdünnt); Anlage A; Methode 1 (30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule.....	40
Abbildung 38: Injektion von Urin B (1,35 µg/l Glyphosat, 1:200 verdünnt) und 10 µg/l GlyFMOC; Anlage A; Methode 1 (15 – 57 % ACN im Gradienten, KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5; 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	41
Abbildung 39: Injektion von dotiertem Urin B (40 µg/l); Anlage A; Methode 1 (15 – 75 % ACN im Gradienten; KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 5; 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	42
Abbildung 40: Injektion von Urin C; Aufarbeitung mit ChromSystems-Reagenzien; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	42

Abbildung 41: Injektion von 9,5 µg/l GlyFMOC; Aufarbeitung mit ChromSystems-Reagenzien; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	43
Abbildung 42: Injektion von 10 µg/l, 5 µg/l und 0,5 µg/l GlyFMOC; Anlage A; Methode 1; 5 µm Trennsäule; Vergrößerte Darstellung	46
Abbildung 43: Injektion von 0,75 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	48
Abbildung 44: Konzentrationen der GlyFMOC-Standards aufgetragen gegen die Peakfläche	49
Abbildung 45: Konzentrationen der Glyphosat-Standards aufgetragen gegen die Peakfläche	50
Abbildung 46: Schematisch dargestellter Herstellungsprozess einer Affinimip Kartusche	55
Abbildung 47: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	63
Abbildung 48: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	63
Abbildung 49: Injektion von Wasser (HPLC-grade); Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	64
Abbildung 50: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	64
Abbildung 51: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule (neue Vorsäule eingebaut)	65
Abbildung 52: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, KH ₂ PO ₄ -Puffer neu hergestellt, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule	65
Abbildung 53: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	66
Abbildung 54: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	66

Abbildung 55: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	67
Abbildung 56: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	67
Abbildung 57: Injektion von 2 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	68
Abbildung 58: Injektion von 5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	68
Abbildung 59: Injektion von 5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min, Signalverstärkung um Faktor 10 verringert); 5 µm Trennsäule	69
Abbildung 60: Injektion von 5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	69
Abbildung 61: Injektion von 12 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	70
Abbildung 62: Injektion von 9 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	70
Abbildung 63: Injektion von 6 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	71
Abbildung 64: Injektion von 3 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	71
Abbildung 65: Injektion von 1,5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	72
Abbildung 66: Injektion von 0,75 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	72
Abbildung 67: Injektion von 12 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	73
Abbildung 68: Injektion von 9 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	73
Abbildung 69: Injektion von 6 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	74
Abbildung 70: Injektion von 3 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	74

Abbildung 71: Injektion von 1,5 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3	
(Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	75
Abbildung 72: Injektion von 0,75 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3	
(Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der LC ₅₀ -Werte verschiedener Fische gegenüber reinem Glyphosat und Roundup	6
Tabelle 2: Laufmittel-Gradient der HPLC-Messung nach der Methode des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen.....	18
Tabelle 3: Gradientenverlauf der HPLC-Methode nach Küsters und Gerhartz.....	19
Tabelle 4: Vergleich von gemessenen GlyFMOC-Standards in Bezug auf Retentionszeit, Peakfläche und Konzentration	29
Tabelle 5: Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration des GlyFMOC-Standards	30
Tabelle 6: Konzentrationen, Retentionszeiten und Peakflächen der Glyderiv-Standards	30
Tabelle 7: Gradientenverlauf bei der Messung der dotierten Futterprobe.....	33
Tabelle 8: Vergleich der Flächen von Grundlinien-Peaks und dem Peak eines 0,75 µg/l GlyFMOC-Standards	48

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
a.	and
ACN	Acetonitril
AMPA	Aminomethylphosphorsäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Dr.	Doktor
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthetase
FMOC-Cl	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
g/mol	Gramm pro Mol
Glyderiv	im Labor derivatisierte Glyphosat-Lösung
GlyFMOC	gekaufte Glyphosat-FMOC-Lösung
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
log K _{ow}	Logarithmus des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten
KCL	Kaliumchlorid-Lösung
kg/ha	Kilogramm pro Hektar
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

max.	maximal
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mg/l	Milligramm pro Liter
min	Minute
ml	Milliliter
NOEL	No Observed Effect Level
OPA	o-Phthaldialdehyd
Pa	Pascal
ppm	parts per million; millionster Teil
Prof.	Professor
RAC	regulatorisch akzeptable Konzentration
u.	und
UV	Ultraviolettstrahlung
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Nährstoffe und Licht sind wichtige Ressourcen für Pflanzen. Bei Kulturpflanzen kann dichter Unkrautbewuchs zu Ernteeinbußen führen, da die Pflanzen untereinander im Wettbewerb um diese Rohstoffquellen stehen. Das manuelle Entfernen dieser unerwünschten Pflanzen ist im heimischen Garten zu bewältigen, doch auf landwirtschaftlichen Feldern ist daran nicht zu denken. Herbizide, wie Diquat, Paraquat und Glyphosat werden dort zur Beseitigung des Unkrautbewuchses eingesetzt.

1.1 Glyphosat

Glyphosat ist ein nicht selektives Herbizid [URL-1], das in kleinen Mengen auch als Pflanzenwachstumsregulator eingesetzt wird. Zum ersten Mal wurde es 1950 in der schweizer Pharmafirma Cilag von Henry Martin synthetisiert. Da keine pharmazeutische Wirkung festgestellt werden konnte, wurden die Forschungen mit dieser Substanz eingestellt. Glyphosat wurde später von Aldrich Chemicals erworben und weiter erforscht, was die Aufmerksamkeit der Firma Monsanto erregte. Die Herbizidwirkung wurde 1971 von Dr. John E. Franz, einem Mitarbeiter der Firma Monsanto, entdeckt [Parrot et al, 1995; Székács u. Darvas, 2012; Auling, 2009; Stalikas u. Konidari, 2001]. Drei Jahre später wurde es in den USA registriert [URL-1; URL-4]. Heute ist es das meistgenutzte Herbizid (1 Mio. Tonnen in 2010 [URL-1]) und in 130 Ländern registriert [Morshed et al, 2011; Hanke et al, 2008]. Das bekannteste Produkt ist Roundup [Khrolenko u. Wiczorek, 2005], das neben Glyphosat auch Netzmittel enthält [URL-3]. Sein Ansehen verdankt dieses Herbizid seiner Effizienz, den geringen Kosten und dem vorteilhaften Toxizitätsprofil [URL-1; URL-2]. Glyphosat wird in der Land- und Forstwirtschaft [da Silva et al, 2011; Sun et al, 2010] sowie in Gärten, auf Grünflächen und Gleisanlagen, aber auch an Straßenrändern zur Bekämpfung unerwünschter Pflanzen eingesetzt [Lee et al, 2002; Qiang et al, 2009]. Zu den besonders betroffenen landwirtschaftlichen Erzeugnissen gehören Sojabohnen, Feldmais, Heu und Futtergras [Miller et al, 2010]. Da das Hauptabbauprodukt Aminomethylphosphonsäure (AMPA) [URL-4; Hanke et al, 2008] nur in 2 % der untersuchten Lebensmittel nachweisbar war, beschränken sich die Rückstandshöchstmengen auf den Wirkstoff Glyphosat [URL-1]. Um den Einsatz in der

Landwirtschaft zu vereinfachen, wurden einige Nutzpflanzen, wie Sojabohnen [da Silva et al, 2011], Mais, Baumwolle und Raps, gentechnisch so verändert, dass sie bei einer Behandlung mit Glyphosat keinen Schaden nehmen [URL-1]. Der Anbau solcher Pflanzen hat aber einen verstärkten Einsatz von Glyphosat zur Folge [URL-3; Székács u. Darvas, 2012; Rubio et al, 2003].

1.1.1 Chemische Eigenschaften

Der chemische Name von Glyphosat lautet N-(Phosphonomethyl)glycin [Küsters und Gerhartz, 2010; Hanke et al, 2008]. Der farb- und geruchlose Stoff liegt bei Raumtemperatur fest und kristallin vor [Auling, 2009]. In der Mitte des Moleküls befindet sich eine sekundäre Aminogruppe. An einem Ende befindet sich eine Carboxylgruppe und am anderen eine Phosphorsäuregruppe [Székács u. Darvas, 2012]. Das Molekulargewicht liegt bei 169,07 g/mol [Miller et al, 2010; Küsters u. Gerhartz, 2010]. Bei 25 °C weist Glyphosat einen Dampfdruck von weniger als $1,0 \cdot 10^{-5}$ Pa auf, damit zählt es nicht zu den flüchtigen Stoffen [Auling, 2009]. Das Glycin-Derivat löst sich gut in Wasser (12 g/l bei 25 °C [Székács u. Darvas, 2012; Küsters u. Gerhartz, 2010]), aber nur schlecht in Fett und organischen Lösungsmitteln [Auling, 2009; Székács u. Darvas, 2012], was der log K_{ow} von weniger als -3,2 auch zeigt [Miller et al, 2010]. Diese schwache organische Säure ist sehr polar [URL-2] und besitzt Dissoziationskonstanten von 0,78 und 2,29 sowie 5,96 und 10,98 [URL-1; Székács u. Darvas, 2012; Küsters u. Gerhartz, 2010]. Durch den amphoteren Charakter besitzt Glyphosat bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche ionische Formen, die in Abbildung 1 aufgeführt sind [URL-4]. Der Schmelzpunkt liegt bei 185 °C, wobei es sich bereits bei 187 °C zersetzt [Auling, 2009].

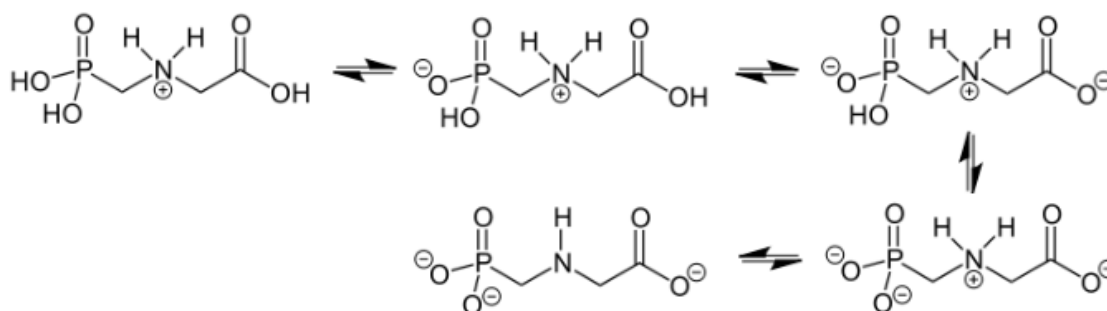


Abbildung 1: Ionischen Formen des Glyphosats [modifiziert nach URL-6]

1.1.2 Wirkungsweise auf die Flora

Das Herbizid inhibiert das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthetase (EPSPS) und stört damit den Shikimatweg [da Silva et al, 2011; Sun et al, 2010; Stalikas u. Konidari, 2001], indem es die Bindung von Phosphoenol-Pyruvat an das aktive Zentrum des Enzyms verhindert [URL-3, Székács u. Darvas, 2012]. Infolge dessen kommt es zu einer Unterversorgung mit aromatischen Aminosäuren [Rubio et al, 2003; Anadón et al, 2009], die entscheidend für die Proteinsynthese und das Pflanzenwachstum sind [Sun et al, 2010; Anadón et al, 2009]. Phosphoenyl-Pyruvat ist ein zentrales Stoffwechselprodukt aller Organismen, daher sind auch Auswirkungen auf andere Stoffwechselvorgänge möglich [URL-3]. Gentechnisch veränderten glyphosatresistenten Pflanzen wurde ein Bakteriengen übertragen, das für die Bildung einer modifizierten EPSPS zuständig ist, die nicht durch das Herbizid inhibiert werden kann. Die Pflanzen nehmen Glyphosat über die Blätter auf und verteilen es im ganzen Organismus [da Silva et al, 2011; Stalikas u. Konidari, 2001], wobei es sich im Meristemgewebe ansammelt [Székács u. Darvas, 2012]. Behandelte Pflanzen zeigen verkümmertes Wachstum und Verkrüppelungen, gefolgt von Nekrosen [Székács u. Darvas, 2012; Anadón et al, 2009]. Auch der Verlust der grünen Farbe ist eine Folge, da Glyphosat die Biosynthese von Chlorophyll beeinflusst [Székács u. Darvas, 2012]. Innerhalb von 4 – 20 Tagen stirbt die Pflanze ab. Das Natriumsalz des Glyphosats wird wiederum als Wachstumsregulator eingesetzt und beschleunigt auch die Fruchtreifung. Da der Shikimatweg nur in Pflanzen und in einigen Bakterien vorhanden ist, wurde von einer geringen Toxizität für Tiere ausgegangen [Miller et al, 2010; URL-3; Anadón et al, 2009].

1.1.3 Verbleib und Abbau in der Umwelt

Der Abbau von Glyphosat im Boden hängt stark von der Zusammensetzung des Bodens und vom vorherrschenden Klima ab [URL-4]. Das Herbizid wird weniger chemisch bzw. photochemisch abgebaut. Vielmehr wird es von Mikroorganismen aerob oder anaerob wie in Abbildung 2 dargestellt, zu Kohlendioxid und einfachen anorganischen Verbindungen zersetzt [URL-1; URL-4; Zelenkova u. Vinokurova, 2008]. Ein Nachweis von AMPA heißt nicht gleich, dass Glyphosat vorlag und abgebaut wurde, denn AMPA ist ein Abbauprodukt verschiedener Stoffe, wie z.B.

Amino-tris-(methylenphosphonsäure), Ethylen-di-amin-tetra-(methylenphosphonsäure) und Hexa-methylen-di-amin-tetra-(methylenphosphonsäure) [URL-4]. Durch die feste Adsorption an Bodenpartikel ist Glyphosat nicht mobil im Boden [Hanke et al, 2008; Rubio et al, 2003]. Die Halbwertszeit beträgt 2 – 197 Tage [URL-4], in Äckern sogar nur 47 Tage [Rubio et al, 2003].

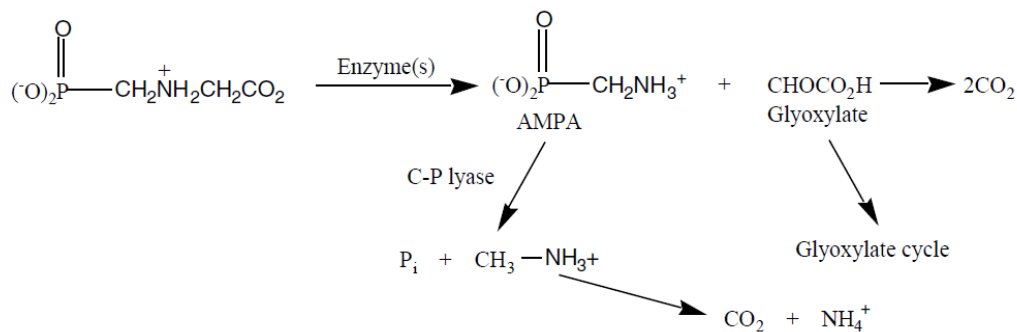


Abbildung 2: Abbaureaktionen von Glyphosat im Boden [URL-4]

Im Wasser enthaltenes Glyphosat wird nicht hydrolysiert und ebenfalls nicht photochemisch abgebaut [URL-4]. Es hat eine Halbwertszeit von einigen Tagen bis zwei Wochen, da Glyphosat sich im Sediment festsetzt [URL-4]. Dabei wird die Adsorption von im Sediment enthaltenen Metallen beeinflusst. N-(phosphonomethyl)glycine besitzt aufgrund der starken Adsorption geringes Potenzial das Grundwasser zu kontaminieren. Eher können durch direkte Wassermanagement (Abtöten von Wasserpflanzen und Algen), unsachgemäßes Spritzen oder Bodenerosion Oberflächengewässer kontaminiert werden [Miller et al, 2010]. Der intensive Spritzeinsatz von Glyphosat kann trotz geringem Dampfdruck zu Rückständen in der Luft führen und bildet damit einen potenziellen Expositionsweg für Feldarbeiter und Bewohner der Umgebung, aber auch für Tiere (Wild-, Haus- und Nutztiere) [Morshed et al, 2011]. Durch die sehr geringe Fettlöslichkeit, wird das Risiko der Bioakkumulation reduziert [URL-1]. Pflanzen, die das Glyphosat hauptsächlich über die Blätter und weniger durch die Wurzeln aufnehmen, verteilen es über das Phloem in der ganzen Pflanze, wobei sich das Herbizid im Meristem, jungen Trieben und unterirdischen Bestandteilen ansammelt. In Salat, Karotten und Gerste wurden ein Jahr, nachdem der Boden mit 1,68 kg/ha Glyphosat behandelt wurde, noch Rückstände nachgewiesen. [Miller et al, 2010]

1.1.4 Metabolismus

Wird Glyphosat eingenommen, so absorbiert der Körper über dem Magen-Darm-Trakt ca. 30 – 35 % des Glyphosats. Die Aufnahme über die Haut ist minimal [Morshed et al, 2011]. Das Herbizid unterliegt kaum dem Stoffwechsel und wird daher größtenteils über den Kot bzw. Urin unverändert wieder ausgeschieden. [Miller et al, 2010]

1.1.5 Toxizität gegenüber der Fauna

Der Mechanismus der toxischen Wirkung von Glyphosat in Tieren ist noch unbekannt, aber Studien zeigten einen LD₅₀-Wert von 4320 – 5000 mg/kg für Ratten bei Glyphosat-Einnahme [Miller et al, 2010]. Für Mäuse lag er bei über 10 000 mg/kg und für Ziegen bei 3530 mg/kg [URL-1]. Beagles, die ein Jahr lang täglich mit Glyphosat-Konzentrationen von 20 mg/kg, 100 mg/kg und 500 mg/kg gefüttert wurden, zeigten keinerlei Beschwerden. Ein erhöhtes Lebergewicht, Linsenanomalien und grauer Star wurden bei Ratten beobachtet, die täglich 940 mg/kg Glyphosat aufgenommen haben. Der NOEL-Wert für männliche Ratten liegt bei 362 mg/kg pro Tag und für weibliche Ratten bei 457 mg/kg pro Tag. Versuche mit trächtigen Ratten zeigten eine verringerte Gewichtszunahme beim Muttertier und auch bei den Föten. Trächtige Kaninchen hingegen bekamen Durchfall und Nasenausfluss. Viele starben bei einer täglichen Aufnahme von 350 mg/kg. Über die Haut wird nur ein geringer Teil des Herbizids absorbiert. Dafür liegt der LD₅₀-Wert für Kaninchen bei über 2 000 mg/kg und kann zu leichten Augenreizungen führen, die innerhalb von sieben Tagen abheilen. [Miller et al, 2010]

Durch den niedrigen Dampfdruck ist die Wahrscheinlichkeit größere Mengen Glyphosat einzuatmen sehr gering. Der LD₅₀-Wert für Ratten, die vier Stunden das Herbizid über die Nase eingeatmet haben, lag bei über 4,43 mg/kg [Miller et al, 2010]. Weder Karzinogenität noch Genotoxizität konnten durch Studien nachgewiesen werden [Stalikas u. Konidari, 2001]. Aber eine Verbindung zwischen Glyphosat-Exposition und dem Auftreten von multiplen Myelomen wird vermutet [de Llasera et al, 2005]. Im Zuge von Fütterungsstudien mit Hühnern und Ziegen konnte Glyphosat in Eiern, Milch und Gewebeproben nachgewiesen werden. [Miller et al, 2010]

N-(phosphonomethyl)glycine ist für Süßwasserfische schwach giftig bis ungiftig, wobei der LC_{50} -Wert bei einer Exposition von 48 Stunden bei über 24 – 140 mg/l liegt. Dieser ist für glyphosathaltige Produkte aber deutlich geringer, was die LC_{50} -Werte der in Tabelle 1 angegebenen Fischarten zeigen. Für Meeresorganismen ist Glyphosat ebenfalls schwach giftig bis ungiftig. Das Herbizid ist nicht bienentoxisch und der LC_{50} -Wert für Regenwürmer bei Exposition mit Roundup liegt bei mehr als 5 000 ppm. [Miller et al, 2010]

Tabelle 1: Vergleich der LC_{50} -Werte verschiedener Fische gegenüber reinem Glyphosat und Roundup [Miller et al, 2010]

Fisch	LC_{50} (Glyphosat) in mg/l	LC_{50} (Roundup) in mg/l
Regenbogenforelle	140	8,3
Elritze	97	2,4
Katzenwels	130	13,0
Sonnenbarsch	150	6,4

Glyphosat führt zwar erst in hoher Konzentration zum Tode, doch können geringere Gehalte den Organismus schwächen, sodass sich z.B. ein Bakterien- oder Pilzbefall einstellen kann.

1.1.6 Symptome bei Tieren und Menschen nach Exposition

Nach Aufnahme von Glyphosat durch Tiere kann es zu Appetitlosigkeit, Lethargie, erhöhtem Speichelfluss, Erbrechen und zu Durchfall kommen. Diese Anzeichen halten 2 - 24 Stunden an. Neben dem Glyphosat können auch die in den Produkten enthaltenen oberflächenaktiven Substanzen die Symptome verstärken bzw. hervorrufen. Klinische Anzeichen, wie Erregbarkeit und Tachykardie, treten 30 min bis zwei Stunden nach Einnahme auf. Weiterhin kann es auch zu Ataxie, Bradykardie, in schweren Fällen auch zu Krämpfen und zum Kreislaufkollaps kommen. [Miller et al, 2010]

In 80 bekannten Fällen einer Glyphosat-Vergiftung beim Menschen, wurde der Wirkstoff in 79 Fällen im Zuge von Selbstmordversuchen eingenommen [Yoshioka et al, 2011; Parrot et al, 1995]. Infolge dessen kam es zu Durchfall und Erbrechen, Schluckbeschwerden, Erosion des Gastrointestinaltraktes und zu gastrointestinalen Blutungen [Roberts et al, 2010]. Nur in sieben Fällen trat der Tod ein [Miller et al, 2010]. Das Forscherteam um Prof. Eric-Giles Seralini der Universität von Caen (Frankreich) fand bei Expositionsversuchen mit Plazentazellen heraus, dass diese

durch Glyphosat abgetötet werden. Als Folge dessen kann es zu Fehlgeburten kommen. Das Herbizid beeinflusst die Wirkung der Aromatase, ein Enzym, das entscheidend für die Erzeugung von Östrogenen aus Androgenen ist. Dieser Einfluss ist zwar minimal bei reinem Glyphosat, doch in Form von Roundup wird die Enzymaktivität erst gesteigert und dann unterbunden. [URL-3]

Der Augen- und Schleimhautkontakt kann zu Reizungen führen, wobei ernsthafte schädliche Auswirkungen oft nur bei Exposition mit hochkonzentriertem Glyphosat eintreten z.B. beim Herstellen verdünnter Sprühlösungen aus Konzentrat. Das Einatmen des Sprühnebels kann orale und nasale Beschwerden sowie Kribbeln und Hustenreiz hervorrufen. [Miller et al, 2010]

Eine Langzeitexposition mit Glyphosat kann zu Nierenschäden führen und Auswirkungen auf die Fortpflanzung haben [Auling, 2009].

1.2 Grenzwerte

Laut der Trinkwasserverordnung liegt der Grenzwert für den Gesamtgehalt an Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen und Biozidprodukt-Wirkstoffen bei 0,0005 mg/l. Davon dürfen einzelne Wirkstoffe mit max. 0,0001 mg/l vertreten sein. [URL-10]

Da für Oberflächengewässer und Böden keine Höchstmengen festgesetzt wurden, sind aus vorliegenden ökotoxikologischen Daten regulatorisch akzeptable Konzentrationen (RAC) erarbeitet worden. Für Gewässer wird die RAC von der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) von Algen abgeleitet und liegt bei 64 µg/l. Im Boden diente die NOEC des Regenwurms als Grundlage für die RAC von 6,27 mg/kg. [URL-9]

Nach den festgesetzten Höchstmengen von Glyphosat in Lebens- bzw. Futtermitteln darf in Gemüse, Kern- und Steinobst sowie in Nüssen, Buchweizen, Reis und Hirse 0,1 mg/kg Herbizid vorliegen. In Leinsamen, Roggen und Weizen ist ein Glyphosat-Gehalt bis 10 mg/kg erlaubt. Eine maximale Konzentration von 20 mg/kg ist in Gerste, Hafer, Sorghum sowie in Sojabohnen und Sonnenblumenkernen erlaubt. Ein Glyphosat-Gehalt von 2 mg/kg ist in Tee gestattet, aber nur 0,1 mg/kg in Kaffee und Kakao. Bei Erzeugnissen tierischen Ursprungs darf maximal 0,05 mg/kg Glyphosat enthalten sein. Ausnahmen bilden die Nieren von Schweinen (0,5 mg/kg), Rindern (2 mg/kg) und Geflügel (0,1 mg/kg) sowie Rinderleber (0,2 mg/kg). [URL-9]

1.3 Nachweismethoden von Glyphosat

Werden die Anwendungsbereiche und die verwendeten Mengen von Glyphosat betrachtet, ist es von großer Bedeutung verlässliche Nachweismethoden zu kennen [URL-2]. Dabei spielt die routinemäßige Überwachung des Herbizids und seines Abbauproduktes AMPA in Oberflächen- und Grundwasser sowie in landwirtschaftlichen Erzeugnissen eine große Rolle. Verschiedene Nachweismethoden für Glyphosat, wie HPLC oder Gaschromatographie teilweise gekoppelt mit einem Massenspektrometer, das die Sensitivität der Messung verbessert, werden beschrieben.

Angeboten werden auch komplette ELISA-Testkits, diese erwiesen sich aber als störanfällig. Oft beschränken sich solche Methoden auf Wasserproben, da wenige Matrixbestandteile enthalten sind, die den Testverlauf stören könnten [Lee et al, 2002]. Von Dr. Françoise Parrot und Kollegen wird auch ein Verfahren erläutert, Glyphosat mittels Ionenaustauschchromatographie nachzuweisen. Dafür verwendeten sie einen Aminosäureanalysator (Beckman 6300) [Parrot et al, 1995].

Glyphosat und AMPA sind aufgrund ihrer ähnlichen Struktur gleichermaßen schwer nachzuweisen. Doch ist es wichtig Methoden zu etablieren, mit denen beide Substanzen nachgewiesen werden können, um weitere Entwicklungs- und Validierungsphasen im Falle geänderter Rückstandsdefinitionen zu vermeiden. Weil Glyphosat sehr polar, wasserlöslich und fettunlöslich ist, gibt es Probleme bei der Extraktion. Um das Herbizid aus Proben herauszulösen muss ein wässriges Extraktionsmittel eingesetzt werden, doch dabei können auch andere Stoffe wie Zucker, Aminosäuren oder Salze extrahiert werden, die im weiteren Verlauf stören würden. Eine anschließende Aufreinigung über eine Kartusche ist ebenfalls problematisch, wegen der amphoteren Natur des Glyphosats. Als Alternative wird häufig die Flüssig-Flüssig-Extraktion angewendet. [URL-1]

Der ionische und polare Charakter sowie die Abwesenheit einer chromophoren Gruppe gestaltet die Detektion mittels Fluoreszenz bzw. UV-Licht schwierig [Küsters u. Gerhartz, 2010]. Durch chemische Reaktion mit einer chromophoren Substanz, die an einer oder an mehreren Stellen bindet, kann Glyphosat detektierbar gemacht werden. Dabei ändern sich auch die Eigenschaften der Substanz, z.B. kann die Polarität reduziert werden. Solch ein Derivatisierungsreagenz ist 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid (FMOC-Cl), das an die Aminogruppe des

Herbizids bindet und dabei Salzsäure (HCl) freisetzt. In Abbildung 3 wird die Reaktion von Glyphosat mit FMOC-Cl schematisch dargestellt. Glyphosat kann auch durch o-Phthaldialdehyd (OPA) [URL-11] und p-Toluolsulfonylchlorid (Tosylchlorid) [Kawai u. Uno, 1991] derivatisiert werden. Wird OPA verwendet, so erfolgt die Detektion über einen Fluoreszenzdetektor. Im Falle von Tosylchlorid kann auch eine UV-Detektion erfolgen [Kawai u. Uno, 1991; URL-11].

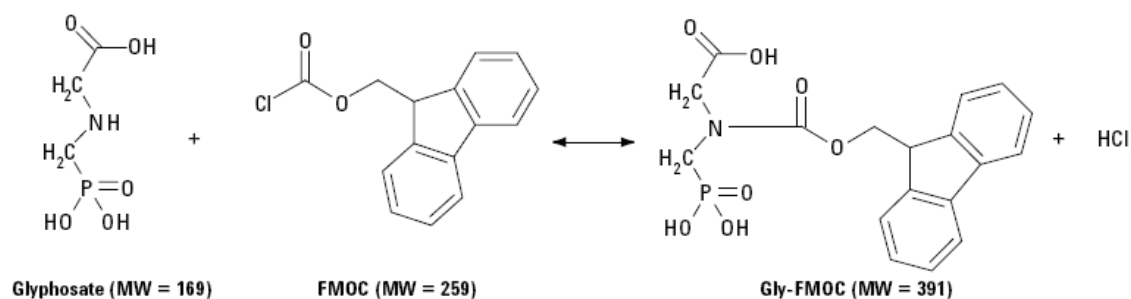


Abbildung 3: Chemische Reaktion von Glyphosat mit FMOC-Cl [URL-2]

Die Derivatisierungsreaktion mit FMOC-Cl läuft in einem basischen Umfeld ab, für das oft ein Boratpuffer mit pH 9 sorgt. Er neutralisiert die entstehende Säure und fördert die Derivatisierungsreaktion. Doch FMOC-Cl ist nicht spezifisch und reagiert daher mit jeder Aminogruppe. [URL-1] Diese Derivatisierungsmethode wird häufig bei HPLC-Messungen mit einem Fluoreszenz-Detektor eingesetzt, doch natürliche Probenbestandteile können zu Störungen führen und die Sensitivität beeinflussen. Auch eine Vorsäulenderivatisierung mit anschließender on-line Festphasen-Extraktion wäre eine mögliche Alternative [Lee et al, 2002].

2 Zielstellung

Durch die großen Mengen Glyphosat, die jährlich im Landwirtschaftlichen Bereich eingesetzt werden, kann das Herbizid auch auf unseren Tellern landen. Nicht nur über pflanzliche Nahrungsmittel, deren Bestandteile auf behandelten Felder gewachsen sind, sondern auch über tierische Nahrungsmittel. Nutztiere können Glyphosat über das Futter aufnehmen und durch den Verzehr von Fleisch kann es in den Stoffwechsel des Menschen gelangen. Um zu verhindern, dass Menschen und Tiere durch die Aufnahme von Glyphosat Schaden nehmen, müssen Rohstoffe für Lebens- und Futtermittel auf ihren Glyphosatgehalt untersucht werden. Der Nachweis des Herbizids im Urin ist bei der Diagnose glyphosatbedingter Erkrankung von großer Bedeutung. Ist die Ursache einer Erkrankung bekannt, so kann auch dagegen vorgegangen werden.

Da Glyphosat sehr polar, wasserlöslich und fettunlöslich ist, lässt es sich schwer aus Proben extrahieren. Ferner enthält es keine chromophore Gruppe, was die Detektion erschwert. Vermutlich bieten aus diesen Gründen nur wenige Labore Glyphosatanalysen an. Oftmals beschränken sich diese auf Wasserproben, da sie nur wenige Matrixbestandteile enthalten, die die Messungen stören würden. Die Firma BioCheck – Labor für Veterinärdiagnostik und Umwelthygiene GmbH arbeitet schon seit Jahren im Bereich der Nutztierdiagnostik und bietet Futtermittelanalysen an. Aufgrund des ständig steigenden Glyphosat-Einsatzes, erhöht sich auch das Risiko einer Glyphosatintoxikation. Daher soll eine zuverlässige HPLC-Methode zum Nachweis des Herbizides in Futtermitteln und Urinproben etabliert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

- Acetonitril (HPLC-grade), VWR
- Acetonitril (pure Analysis), Fisher Scientific
- Ameisensäure (98 – 100 %), Merck KGaA
- Ammoniak-Lösung (pure Analysis), Merck KGaA
- Borsäure (> 99,5 %), Sigma-Aldrich
- deionisiertes Wasser
- Dinatriumtetraborat-decahydrat (pure Analysis), Merck KGaA
- Ethylacetat (pure Analysis), VWR
- 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid (> 99,0 %, für HLPC-Derivatisierung), Sigma-Aldrich
- Glyphosat-FMOC (97,0 %), 10 mg/l, gelöst in Wasser, Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers
- Kaliumchlorid (pure Analysis), KMF Laborchemie Handels-GmbH
- Kaliumdihydrogenphosphat (pure Analysis), AppliChem
- Methanol (HPLC-grade), Th. Geyer GmbH & Co. KG
- N-(Phosphonomethyl)glycin (98,0 %), 10 g, Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers
- Natriumacetat (wasserfrei), Merck KGaA
- Natriumhydrogencarbonat (pure Analysis), Carl Roth GmbH & Co. KG
- Neutralisation Reagent, 52005, Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
- Natriumchlorid (pure Analysis), AppliChem
- Natriumhydroxid (1N; pure Analysis), AppliChem
- Phosphorsäure (85 %), Merck KGaA
- Precipitation Reagent, 52005, Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
- Salzsäure (1N; pure Analysis), AppliChem
- Wasser (HPLC-grade), VWR

3.2 Material

- Chromabond PS-H⁺/ PS-OH⁻ (6 ml, 500 mg), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
- Chromabond HR-XC (3 ml, 200 mg), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
- Faltenfilter, 595 ½ , Ø 110mm, Whatman GmbH
- Homogenisierbeutel, 400 ml, VWR
- Strata X-AW (3 ml, 200 mg), Phenomenex
- Strata C18 (3 ml, 200 mg), Phenomenex

3.3 Geräte

- HPLC-Anlage Universität Leipzig, Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut (Anlage A)
 - Entgaser, Knauer GmbH
 - HPLC Pumpensystem, Knauer GmbH
 - HPLC Autosampler, Knauer GmbH
 - Säulenofen, Knauer GmbH
 - Fluoreszenz-Detektor, Shimadzu
 - Chromgate Software für die Auswertung
- HPLC-Anlage BioCheck GmbH (Anlage B)
 - Fluoreszenz-Detektor FP-1520, Jasco Corporation
 - HPLC Autosampler 565, Bio-Tek Kontron Instruments
 - HPLC Pumpensystem 52x, Bio-Tek Kontron Instruments
 - Degasser 3493, Bio-Tek Kontron Instruments
 - HPLC 585 Column Thermostat, Bio-Tek Kontron Instruments
 - Kroma System 3000 Software für die Auswertung
- Labofuge 400 R, Heraeus function line
- Mastikator, IUL Instruments
- MiniSpin plus, Eppendorf
- Nucleodur C18 Gravity (250 mm, 3µm), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
- Nucleodur C18 Gravity (250 mm, 5µm), Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
- pH-Meter, Schott
- Rollenmischer RM 52, Nr. 348, Assistent

3.4 Probenmaterial

- Futtermittel A, Mischfutter
- Futtermittel B, Mischfutter
- Urinprobe A
- Urinprobe B
- Urinprobe C

4 Methoden

4.1 Herstellung der Standardlösungen

Die Glyphosat-FMOC-Lösung (GlyFMOC) wurde bereits derivatisiert erworben, sodass eine Verdünnung des Konzentrats ausreicht um sie als Standard-Lösung zu messen. Das Verdünnen wurde mit Wasser (HPLC-grade) durchgeführt.

Eine Stammlösung wurde zunächst aus reinem kristallinem Glyphosat gelöst in 2 ml Wasser (HPLC-grade) hergestellt (Glyderiv) und entsprechend dem Bedarf mit Wasser (HPLC-grade) weiter verdünnt.

4.2 Probenaufarbeitung

4.2.1 Futtermittel

In Anlehnung an die Präsentation von Harald Molitor zum Thema „Selektive Anreicherung der Totalherbizide Glyphosat, Glufosinat und AMPA aus Wasserproben“ [URL-7] wurden die ersten Futtermittel-Proben aufgearbeitet.

In einen Homogenisierbeutel wurden 10 g der gemahlten Futtermittel-Probe eingewogen und 50 ml deionisiertes Wasser hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde anschließend 5 min mazeriert. Um den klaren Überstand zu gewinnen wurde die Lösung filtriert. Zur Extraktion von enthaltenen Fetten und darin gelösten Substanzen wurden 25 ml Überstand mit 5 ml Chloroform versetzt und 5 min durchmischt. Nachdem das Gemisch 10 min zentrifugiert wurde, wurden 12,5 ml der oberen Phase abgenommen und der pH-Wert mit Salzsäure auf 3 eingestellt. Im Anschluss wurden zwei verschiedene Arten von Ionen-Austauscher Kartuschen der Firma Macherey-Nagel zur Aufkonzentrierung getestet.

Die Ionen-Austauscher der Art Chromabond PS-H⁺ (Kationen-Austauscher) und Chromabond PS-OH⁻ (Anionen-Austauscher) besaßen ein Volumen von 6 ml und beinhalteten 500 mg Sorbent. Die Chromabond PS-H⁺ Säule wurde zweimal mit 2 ml deionisiertem Wasser konditioniert. Nachfolgend wurden die 12,5 ml Probenextrakt über den Kationen-Austauscher gegeben. Die Chromabond PS-OH⁻ Säule wurde konditioniert, indem jeweils zweimal 2 ml deionisiertes Wasser, Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1 M) und erneut deionisiertes Wasser aufgetragen wurden. Der Durchfluss des Kationen-Austauschers wurde über den Anionen-

Austauscher gegeben und dieser anschließend durch mehrmaliges Durchdrücken von Luft getrocknet. Die Elution erfolgte mit 1 M Kaliumchlorid-Lösung, die in zwei 1 ml Portionen aufgegeben wurden.

Die Kationen-Austauscher Kartusche HR-XC wurde mit 5 ml Methanol und anschließend mit 5 ml deionisiertem Wasser konditioniert. Das gesamte Extrakt von 12,5 ml wurde über die Säule gegeben und diese dann mit 2 ml verdünnter Salzsäure (0,1 M) gewaschen. In der Säule verbliebene Flüssigkeitsreste wurden mit leichtem Überdruck von oben entfernt. Zur Elution wurden 5 ml Methanol mit einem Ammoniak-Gehalt von 5 % (pH 11,3) verwendet. Das Eluat wurde eingetrocknet, in 2 ml Kaliumchlorid-Lösung (1 M) wieder aufgenommen und derivatisiert.

Weitere Versuche der Probenaufarbeitung wurden mit SPE-Säulen der Firma Phenomenex durchgeführt. Dazu wurden Strata X-AW und Strata C18 Kartuschen der Firma Phenomenex verwendet. Der Ablauf bei beiden Säulen-Typen war identisch.

Zur Extraktion des Glyphosats wurden 5 g der gemahlenden Futtermittel-Probe mit 15 ml Natriumacetat-Lösung (0,1 M, pH 4,6) versetzt und für 10 min auf einem Rollmischer platziert. Anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 3500 rfc zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dessen pH-Wert auf 4,1 – 5,1 eingestellt. Die Säule wurde erst mit 6 ml Methanol und dann mit 6 ml Natriumacetat-Lösung (0,1 M; pH 4,6) konditioniert. Nach Durchlaufen von 2 ml Extrakt wurde die Säule mit 6 ml Natriumacetat (0,1 M; pH 4,6) und 6 ml Methanol gewaschen. Für die Elution wurden 6 ml Methanol mit einem Ammoniak-Anteil von 5 % (pH 11,3) verwendet. Bei der Aufreinigung wurde auch die Elution mit Methanol getestet, wobei der entsprechende pH-Wert von 11,3 mit Natronlauge eingestellt wurde. Da sich bei der Derivatisierung nach Zugabe des Ethylacetats keine Phasentrennung einstellte, wurde diese durch Zugabe von 7 ml deionisiertem Wasser erzwungen und wie oben beschrieben fortgesetzt. Um das Problem mit der Phasentrennung und eventuelle Schwierigkeiten bei der Derivatisierungsreaktion zu vermeiden, wurden 2 ml Eluat eingetrocknet, in 2 ml Kaliumchlorid (1 M) wieder aufgenommen und derivatisiert.

4.2.2 Urinproben

Gemessen wurden Urinproben, die mit deionisiertem Wasser verdünnt wurden. Auch die Aufreinigung mit einem Proteinfällungsreagenz der Firma ChromSystems wurde getestet. Dazu wurden 400 µl Urin mit 600 µl Fällungsreagenz versetzt und 30 s geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung für 5 min bei 9000 rfc zentrifugiert und 500 µl des Überstandes in 500 µl der Neutralisierungslösung gegeben. Für die Derivatisierung wurden die angegebenen Mengen halbiert, da nur 1 ml aufgearbeiteter Urin vorlag.

4.3 Derivatisierung

Von den Eluaten bzw. aufgereinigten Extrakten wurden jeweils 2 ml für die Derivatisierungsreaktion eingesetzt. Der verwendete Boratpuffer setzte sich aus zwei Lösungen zusammen. Die Erste bestand aus 0,9554 g Dinatriumtetraborat-decahydrat und 50 ml deionisiertem Wasser. Für die andere Lösung wurden 0,6202 g Borsäure mit 0,146 g Natriumchlorid in 50 ml deionisiertem Wasser gelöst. Beide Lösungen wurden zu gleichen Teilen vermischt und der pH-Wert mit Natriumhydroxid auf 9,5 eingestellt. Die Derivatisierungslösung wurde durch Lösen von 0,013 g FMOC-Cl in 20 ml Acetonitril hergestellt. Zum Eluat bzw. Extrakt wurden 0,1 ml Boratpuffer und 1 ml FMOC-Cl-Lösung gegeben. Nach kurzem Durchmischen wurde diese Lösung für die Reaktionszeit von 60 min bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden 3 ml Ethylacetat hinzugegeben, eine Minute gut durchmischt und 10 min bei 3500 rfc zentrifugiert. Von der unteren wässrigen Phase wurden 1000 µl in ein HPLC-Vial überführt und mit 30 µl verdünnter Salzsäure (30 %) versetzt. Anschließend wurde das Vial für eine Stunde geschüttelt.

4.4 HPLC-Methode

4.4.1 Gradientenmethode mit einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer

Die erste Grundlage bildete eine durch die Firma Macherey-Nagel veröffentlichte Methode [URL-8]. Erstellt wurde sie von R. Reupert und C. Schlett vom Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen und sie beschränkte sich auf Wasserproben.

Eine weitere Methode, veröffentlicht durch Markus Küsters und Michael Gerhartz, wurde berücksichtigt. Aber auch hier wurden ausschließlich Wasserproben untersucht. [Küsters u. Gerhartz, 2010]

Die Methode des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen wurde als Grundlage gewählt, da der pH-Wert des Laufmittels neutral ist und damit die HPLC-Anlage nicht so stark beansprucht wie die Laufmittelzusammenstellung mit verdünnter Phosphorsäure und einem pH-Wert von ca. 1,2.

Aufgrund ihrer guten Trennwirkung und der Stabilität bei niedrigen pH-Werten wurde statt der Nucleosil 100-3 C18 HD, verwendet von Reupert und Schlett, die Nucleodur C18 Gravity, verwendet von Küsters und Gerhartz, mit einer Länge von 250 mm und einer Partikelgröße von 3 µm eingesetzt. Um diese vor Verunreinigungen zu schützen, wurde eine 4 mm lange C18-Vorsäule mit einer Partikelgröße von 3 µm eingebaut.

Die Mobile Phase setzte sich aus Acetonitril und einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (0,002 M; pH 7) zusammen. Die Konzentration der Laufmittelkomponenten wurde über einen Gradienten geregelt. Zu Beginn einer Messung lag der Acetonitril-Gehalt bei 7 %. Innerhalb von 25 min stieg er auf 57 % an und nach weiteren zwei Minuten erreichte er 95 %. Diese Konzentration wurde für 8 min beibehalten. In den folgenden zwei Minuten wurde die Anfangskonzentration von 7 % wieder hergestellt und für 5 min gehalten. Die Gradientenabfolge wird in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Trennsäule wurde auf 25 °C temperiert. Der Fluss betrug 0,5 ml/min und das Injektionsvolumen lag bei 20 µl. Die Detektion mittels Fluoreszenzdetektor erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 258 nm und einer Emissionswellenlänge von 305 nm. Diese Methode wird im weiteren Verlauf der Arbeit als Methode 1 bezeichnet.

Tabelle 2: Laufmittel-Gradient der HPLC-Messung nach der Methode des Landesumweltamtes Nordrhein-Westfalen [URL-8]

vergangene Zeit in min	ACN-Anteil in %	KH₂PO₄-Anteil in %
0	7	93
25	57	43
27	95	5
35	95	5
37	7	93
42	7	93

Die ersten Messungen wurden an der Anlage A durchgeführt. Da sich bei den Messungen ein zu hoher Druck einstellte, erfolgte die Umstellung auf die 250 mm lange Nucleodur C18 Gravity mit einer Partikelgröße von 5 µm und einer 4 mm langen Vorsäule mit einer Partikelgröße von 5 µm. Die HPLC-Anlage A hält einem Arbeitsdruck bis zu 300 bar stand. Auch der Autosampler der Anlage B limitiert durch sein variables Injektionsvolumen den Arbeitsdruck auf max. 300 bar. Um die HPLC-Bedingungen zu optimieren wurden verschiedene Faktoren verändert. Der pH-Wert des Laufmittels wurde auf 5 bzw. 4 gesenkt und die Temperatur des Säulenofens von 25 °C auf 30 °C angehoben. Der Gradient wurde mit einer Acetonitril-Konzentration von 15 % gestartet und der maximale Acetonitril-Anteil von 95 % auf 75 % herabgesetzt.

4.4.2 Isokratische Methode

Das Laufmittel der Methode 2 bestand zu 70 % aus einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (0,002 M; pH 5) und zu 30 % aus Acetonitril. Der Säulenofen temperiert die HPLC-Trennsäule auf 30 °C und der Fluss betrug 0,5 ml/min. Am Fluoreszenzdetektor wurde eine Anregungswellenlänge von 258 nm und eine Emissionswellenlänge von 305 nm eingestellt. Das Injektionsvolumen betrug 20 µl.

4.4.3 Gradientenmethode mit einem Phosphorsäure-Laufmittel

Diese Methode basiert auf der Veröffentlichung von Markus Küsters und Michael Gerhartz [Küsters u. Gerhartz, 2010]. Das Laufmittel war ein Gemisch aus Acetonitril und Phosphorsäure (0,1 %), dessen genaue Zusammensetzung über einen Gradienten geregelt wurde und in Tabelle 3 zusammengefasst wird. In den ersten 25 min lag der Acetonitril-Anteil bei 30 %, stieg innerhalb von 2 min auf 75 % und wurde für weitere 5 min gehalten. In den folgenden 2 min wurden die Anfangsbedingungen von 30 % Acetonitril wieder hergestellt und 5 min beibehalten.

Tabelle 3: Gradientenverlauf der HPLC-Methode nach Küsters und Gerhartz [Küsters et al, 2010]

vergangene Zeit in min	ACN-Anteil in %	H₃PO₄-Anteil in %
0	30	70
27	35	65
30	90	10
36	90	10
38	30	70
45	30	70

Der Säulenofen wurde auf 35 °C eingestellt und das Injektionsvolumen betrug 20 µl. Die Anregungswellenlänge lag bei 258 nm und die Emissionswellenlänge bei 305 nm. Fließgeschwindigkeiten von 0,7 ml/min, 0,6 ml/min und 0,5 ml/min wurden getestet.

5 Ergebnisse

In allen Chromatogrammen zeigten sich Peak-Anhäufungen im Bereich der hohen Acetonitril-Konzentration. Dies ist sowohl bei der 3 μm -Säule als auch bei der 5 μm -Säule zu beobachten.

5.1 Gradientenmethode mit einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer

Die Messungen mit der Nucleodur C18 Gravity (250 mm, 3 μm) wurden an Anlage A durchgeführt. Aufgrund des hohen Drucks, der sich während der Messungen aufbaute, konnten mit der Nucleodur C18 Gravity (250 mm, 3 μm) nur vier aussagekräftige HPLC-Läufe durchgeführt werden. Immer wenn 300 bar erreicht wurden, hat sich das Pumpensystem aus Sicherheitsgründen automatisch abgeschaltet oder der Lauf wurde vorher manuell abgebrochen, um Schäden zu verhindern. Auch Leckagen aufgrund des Drucks führten dazu, dass Messungen abgebrochen werden mussten. Die Abbildung 4 zeigt zwei HPLC-Läufe, bei denen Acetonitril eingespritzt wurde.

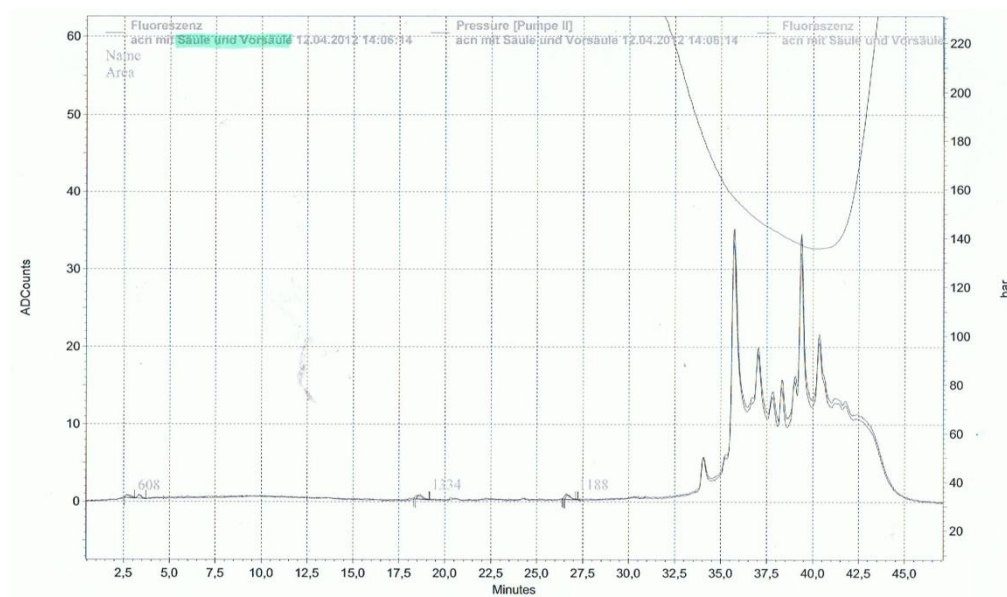


Abbildung 4: Injektion von Acetonitril; Anlage A; Methode 1; 3 μm Trennsäule

Drei kleine Peaks bei 3,4 min, 18,5 min und 26,7 min wurden detektiert. Eine Messung, bei der ein GlyFMOC-Standard mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/l}$ injiziert wurde ist in Abbildung 5 dargestellt.

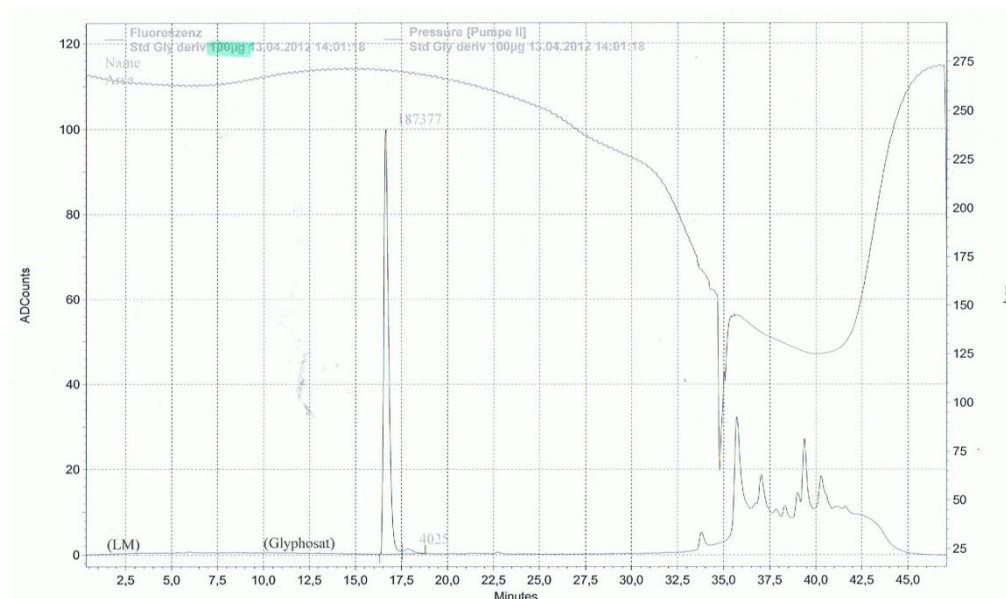


Abbildung 5: Injektion von 100 µg/l GlyFMOc; Anlage A; Methode 1; 3 µm Trennsäule

Ein deutlicher Peak, der in den vorherigen Messungen nicht detektiert worden war, zeigt sich bei 16,0 min mit einer Fläche von 187 377 µVmin.

Ein weiterer Standard, dieses Mal mit einer Konzentration von 5 µg/l, wurde gemessen und wird in Abbildung 6 dargestellt. Bei 10,2 min wurde ein Signal mit einer Fläche von 9 211 µVmin und ein kleiner Nebenpeak mit einer Fläche von 2 342 µVmin detektiert.

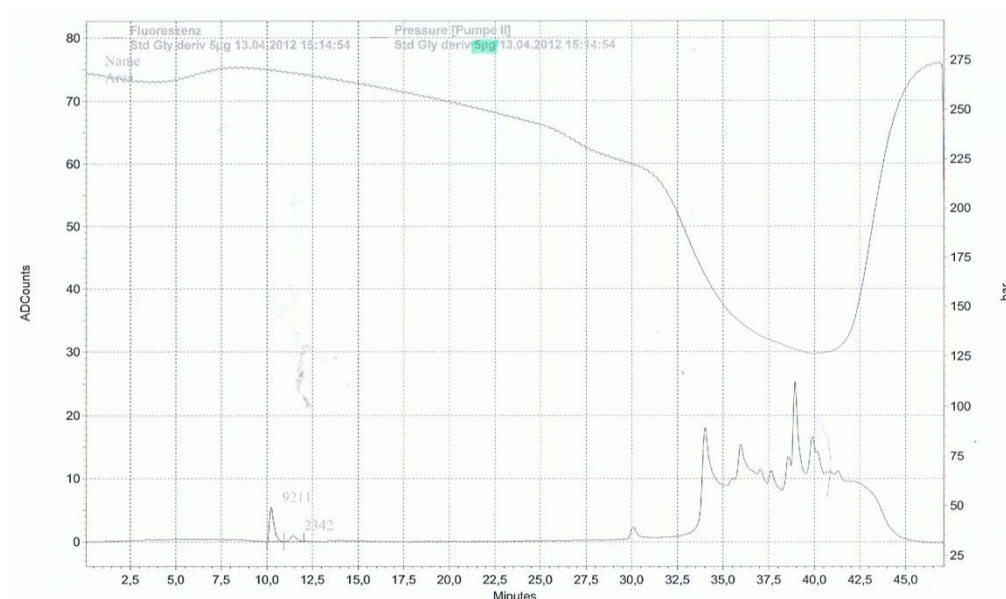


Abbildung 6: Injektion von 5 µg/l GlyFMOc; Anlage A; Methode 1; 3 µm Trennsäule

Jede weitere Messung wurde mit der Nucleodur C18 Gravity (250 mm, 5 μ m) durchgeführt und die Verstärkerstufe um den Faktor 10 erhöht. Drei GlyFMOC-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden gemessen und die Chromatogramme zeigten immer bei 2,9 min einen Peak. Bei dem 10 μ g/l Standard wurde ein Peak mit einer Fläche von 172 472 μ Vmin, bei dem 5 μ g/l Standard ein Peak mit einer Fläche von 85 519 μ Vmin und bei dem 0,5 μ g/l Standard ein Peak mit einer Fläche von 17 762 μ Vmin detektiert. Diese drei Chromatogramme wurden in Abbildung 7 übereinandergelegt dargestellt.

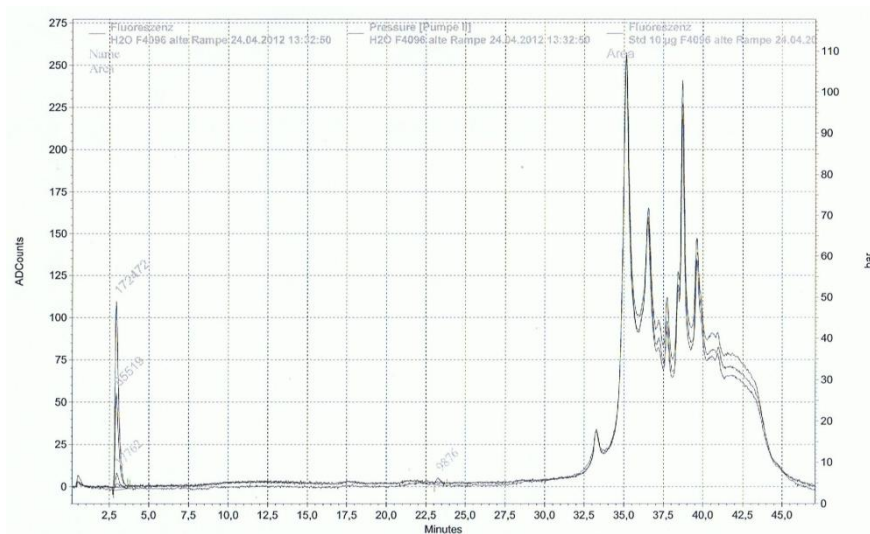


Abbildung 7: Injektion von 10 μ g/l, 5 μ g/l und 0,5 μ g/l GlyFMOC, Anlage A; Methode 1; 5 μ m Trennsäule

Das in Abbildung 8 dargestellten Chromatogramm, zeigt zwei Messungen, bei denen der Säulenofen auf 30 °C und der pH-Wert des Kaliumdihydrogenphosphat-Puffers auf 5 eingestellt wurde. Der kleinere Peak entstand bei der Messung eines 10 μ g/l GlyFMOC Standards und weist eine Fläche von 159 215 μ Vmin sowie eine Retentionszeit von 16,5 min auf. Der höhere Peak zeigt das Signal eines manuell derivatisierten Glyphosat-Standards mit einer Konzentration von ca. 14,33 μ g/l, einer Retentionszeit von 16,0 min und einer Fläche von 432 901 μ Vmin.

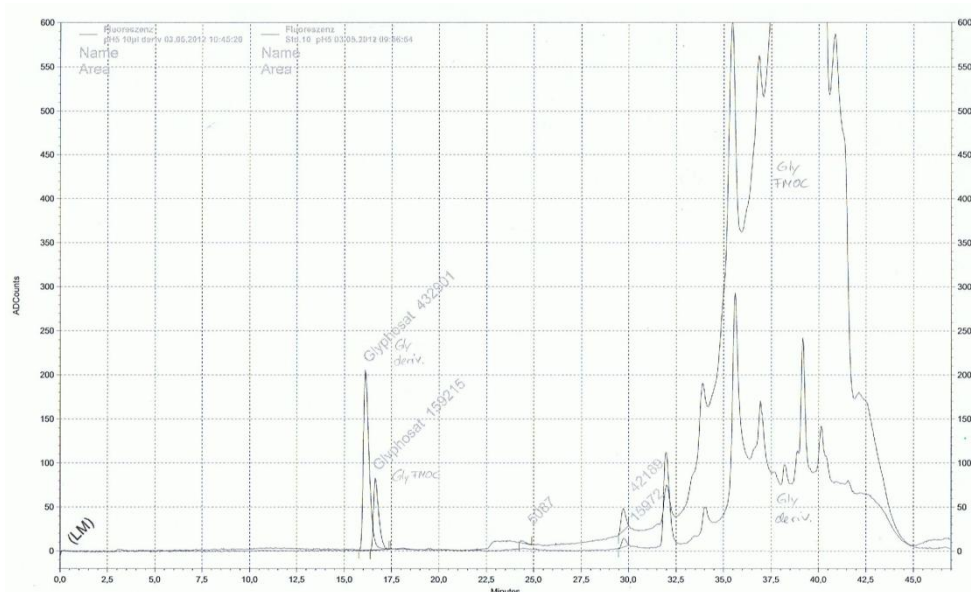


Abbildung 8: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC und 14,33 µg/l derivatisierte Glyphosate-Lösung; Anlage A; Methode 1 (KH₂PO₄-Puffer pH 5; 30 °C Säulentemperatur); 5µm Trennsäule

Bei weiteren Messungen von Standardlösungen zeigten sich immer wieder Peaks mit sehr unterschiedlichen Retentionszeiten. Sie bewegten sich im Bereich zwischen 2,5 min und 15,0 min. Die Abbildung 9 zeigt zwei Chromatogramme, wobei der Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer der einen Messung auf pH 5 und bei der anderen auf pH 4 eingestellt wurde. Beide Male wurde die gleiche Standard-Lösung mit 10 µg/l GlyFMOC injiziert. Die detektierten Peaks haben annähernd die gleichen Retentionszeiten von 3,5 min und Flächen von 84 443 µVmin.

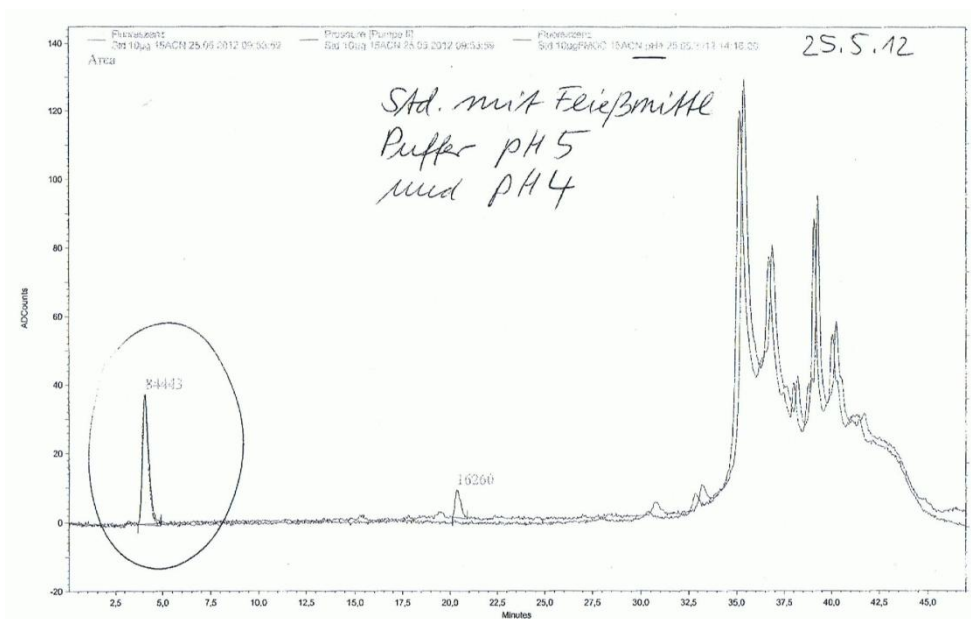


Abbildung 9: Injektion von 10 µg/l; Anlage A; Methode 1 (KH₂PO₄-Puffer pH 5 und pH 4); 5 µm Trennsäule

Es erfolgte eine Umstellung auf HPLC-Anlage B. Dabei blieb die Methode weitgehend unverändert. Der Gradient startete bei 7 % Acetonitril, erreichte aber nur einen max. Acetonitril-Anteil von 75 %. Ansonsten wurde der Gradient nicht weiter verändert. Die Trennsäule wurde auf 30 °C temperiert. Das Injektionsvolumen lag bei 20 µl und der Fluss bei 0,5 ml/min.

Das Chromatogramm der Messung eines 1 µg/l GlyFMOC Standards wird in Abbildung 10 dargestellt und zeigt einen Peak bei 12,3 min mit einer Fläche von 652 514,8 µVmin und einen bei 14,3 min mit 43 736,2 µVmin. Im Vergleich dazu wurde nur der Peak bei 12,2 min mit 336 891,3 µVmin detektiert, als Wasser (HPLC-grade) injiziert wurde (Abbildung 11).

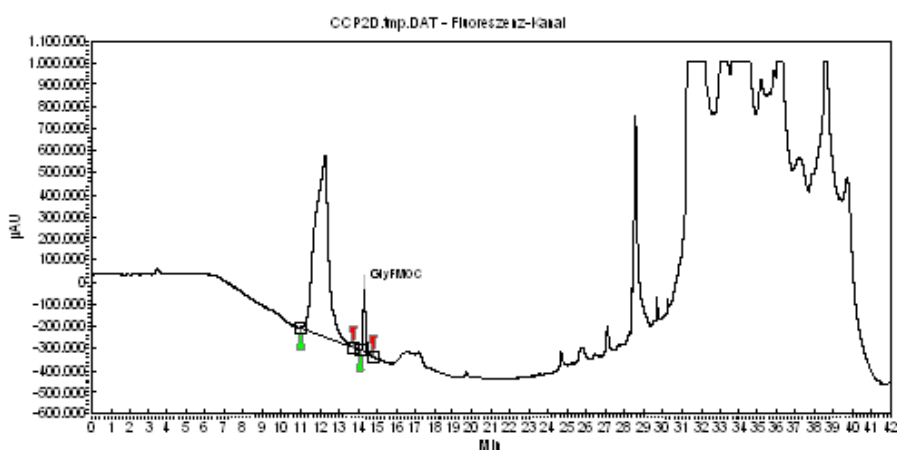


Abbildung 10: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

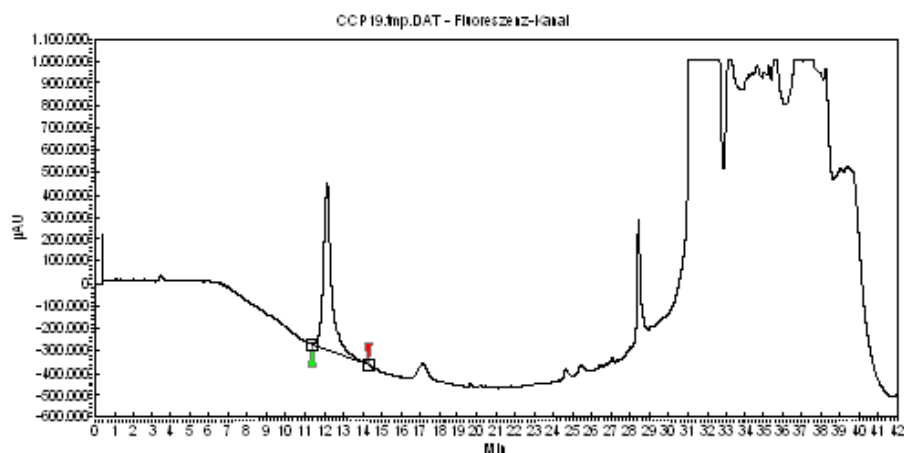


Abbildung 11: Injektion von Wasser (HPLC-grade); Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

Bei unveränderten Bedingungen, wurden weitere Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen gemessen (Chromatogramme siehe Anhang Abbildungen 47 - 52). Zusätzliche Peaks, zeigten sich. Auch intensives Spülen der HPLC-Anlage, Wechseln der Vorsäule oder erneutes Herstellen der Laufmittel führte nicht zu saubereren Grundlinien.

5.2 Isokratische Methode

Bei der ersten Messung, Chromatogramm in Abbildung 12 dargestellt, stieg die Grundlinie noch stark an und zeigte kurz nach der Injektion bei 2,2 min bis 3,0 min einen Peak und bei 6,8 min einen weiteren.

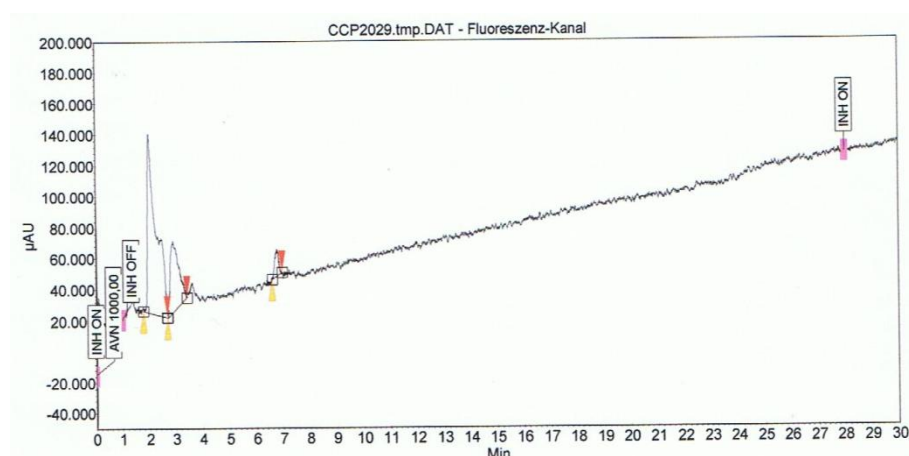


Abbildung 12: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 2; 5 µm Trennsäule

Die Chromatogramme der zwei folgenden HPLC-Läufe, in Abbildung 13 und 14 wiesen ebenfalls diesen Peak bei 2,2 min auf. Nach 6,7 min wurde jeweils ein Peak detektiert und auch nach 9,0 min wurde ein Signal gemessen, obwohl in beiden Fällen Laufmittel eingespritzt wurde.

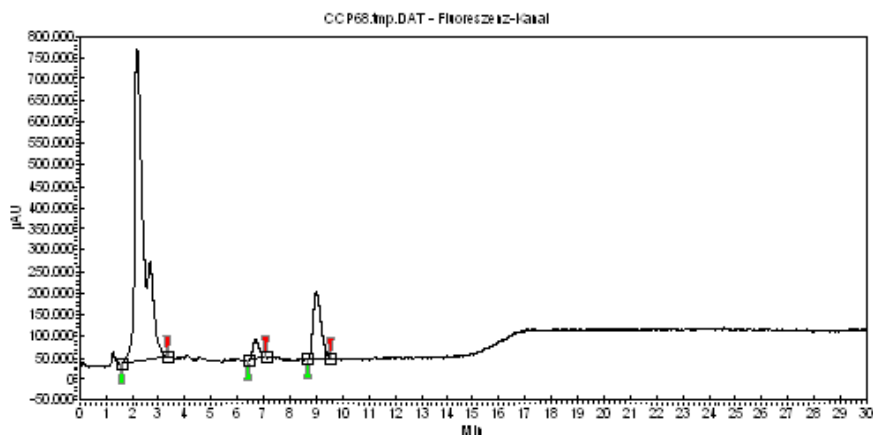


Abbildung 13: Injektion von Laufmittel (70% KH_2PO_4 -Puffer; 30% ACN); Anlage B; Methode 2; 5 μm Trennsäule

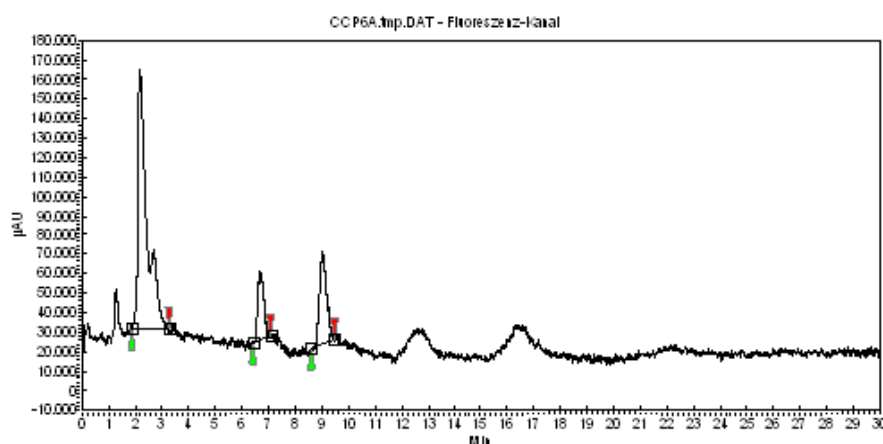


Abbildung 14: Injektion von Laufmittel (70% KH_2PO_4 -Puffer; 30% ACN); Anlage B; Methode 2; 5 μm Trennsäule

5.3 Gradientenmethode mit einem Phosphorsäure-Laufmittel

Bei den ersten Messungen mit dieser Methode lag der Fluss bei 0,7 ml/min und das Chromatogramm eines 10 $\mu\text{g/l}$ GlyFMOC Standards in Abbildung 15 zeigt einen deutlichen Peak bei 6,0 min mit einer Fläche von 282 313,2 μVmin . Auch die Messung eines 2 $\mu\text{g/l}$ Standards in Abbildung 16 weist bei 6,0 min einen nunmehr kleineren Peak mit 54 805,0 μVmin auf. Die Chromatogramme zeigen jeweils einen kleinen Peak bei 4,7 min.

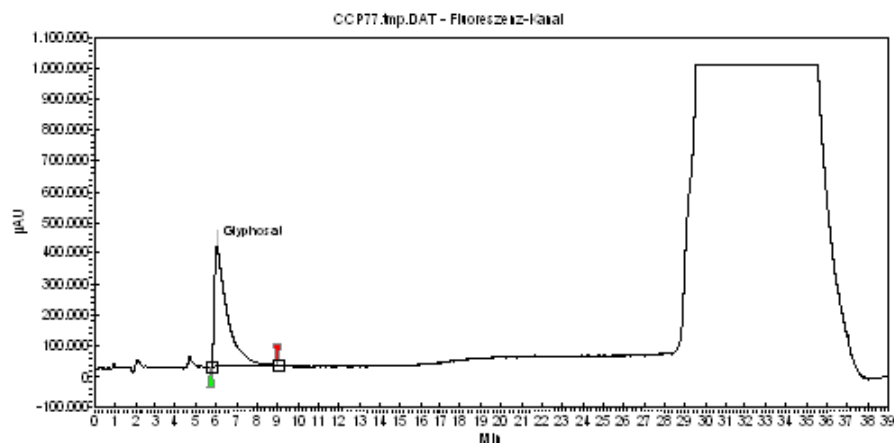


Abbildung 15: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3; 5 µm Trennsäule

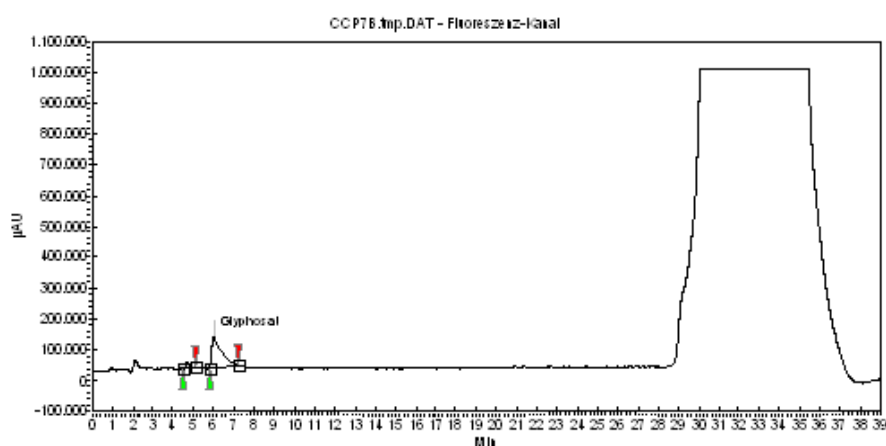


Abbildung 16: Injektion von 2 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3; 5 µm Trennsäule

Die Abbildung 17, 18 und 19 zeigen Chromatogramme einer Messreihe von 10 µg/l GlyFMOC-Standards, bei deren Messungen der Fluss variiert wurde. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,7 ml/min wurde die in Abbildung 17 dargestellte Messung durchgeführt. Die Retentionszeit liegt bei 6,8 min und die Peakfläche beträgt 308 281,6 µVmin.

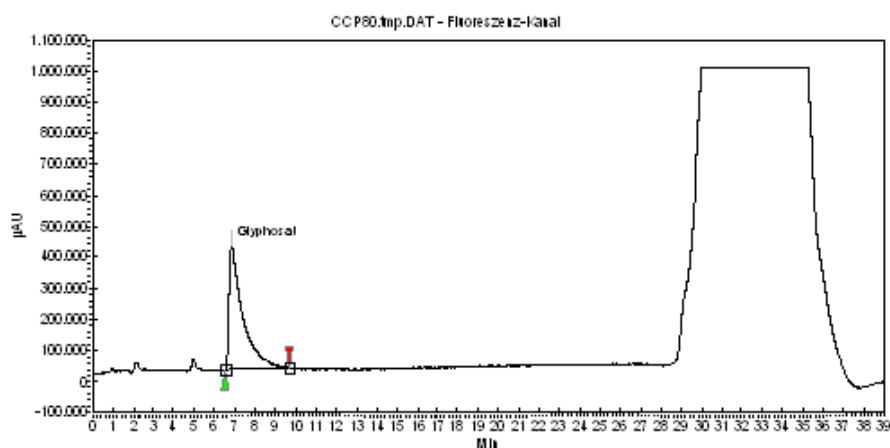


Abbildung 17: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,7 ml/min); 5 µm Trennsäule

Bei der folgenden Messung wurde der Fluss auf 0,6 ml/min gesenkt und das dazugehörige Chromatogramm ist in Abbildung 18 zu sehen. Dieser Peak wurde nach 6,8 min detektiert und besitzt eine Fläche von 358 251,8 µVmin.

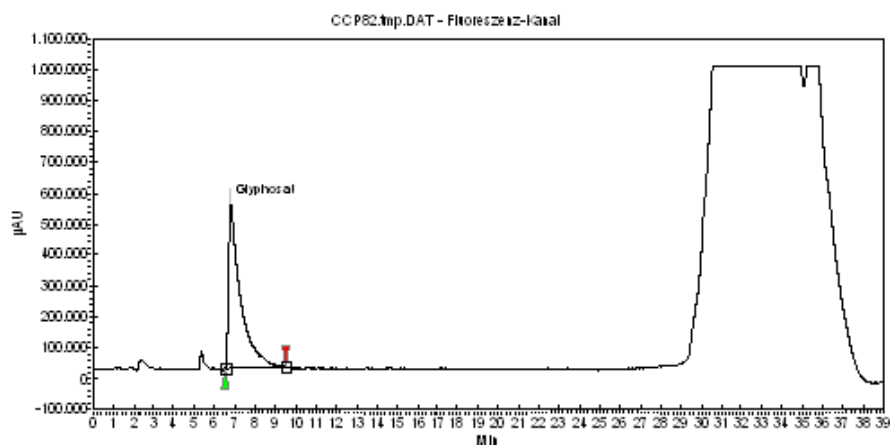


Abbildung 18: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,6 ml/min); 5 µm Trennsäule

In Abbildung 19 wird die Messung bei einem Fluss von 0,5 µl/min gezeigt, wobei die Retentionzeit bei 7,7 min liegt und die Peakfläche 427 637,0 µVmin beträgt.

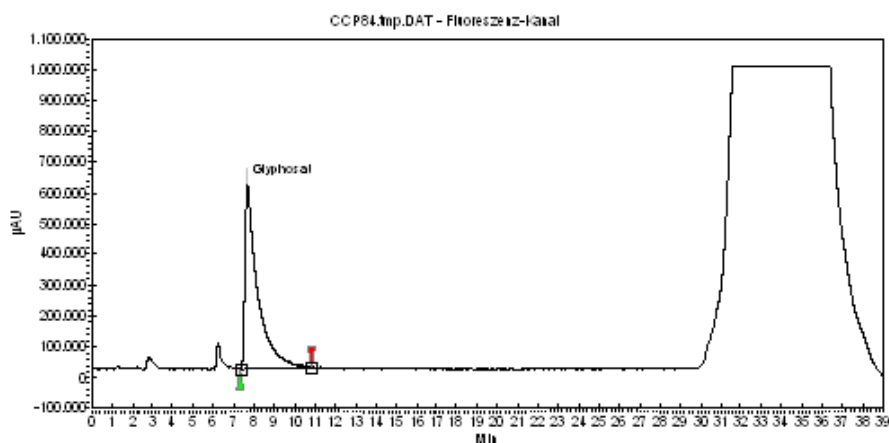


Abbildung 19: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

Die Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurde für weitere Messungen beibehalten. Die Chromatogramme dieser Messungen von unterschiedlichen Messtagen, zu finden im Anhang Abbildungen 53 - 60, wiesen ähnliche Retentionszeiten auf. Einen Überblick über die Standard-Konzentrationen, Retentionszeiten und Peakflächen wird in Tabelle 4 dargestellt. Werden die Flächen der 1 µg/l Standards auf 5 µg/l oder 10 µg/l hochgerechnet, so fällt auf dass die Peakflächen der 5 µg/l Standards aus der Reihe fallen.

Tabelle 4: Vergleich von gemessenen GlyFMOC-Standards in Bezug auf Retentionszeit, Peakfläche und Konzentration

Konzentration in µg/l	Retentionszeit in min	Peakfläche in µVmin
10	7,03	377 131,0
10	7,77	402 729,4
5	6,87	251 935,3
5	7,29	231 055,0
5	7,37	264 432,6
2	7,04	77 025,8
1	7,84	39 960,9
1	7,77	33 212,1

Die in Abbildungen 61 – 66 (Anhang) aufgeführten Chromatogramme zeigen eine Messreihe von GlyFMOC-Standards mit Konzentrationen von 12 µg/l, 9 µg/l, 6 µg/l, 3 µg/l, 1,5 µg/l und 0,75 µg/l. Die Retentionszeiten und Peakflächen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Abhängigkeit der Peakflächen von der Konzentration des GlyFMOC-Standards

Konzentration in µg/l	Retentionszeit in min	Peakfläche in µVmin
12	6,46	578 124,7
9	6,59	484 109,1
6	6,72	285 618,1
3	6,81	143 880,4
1,5	6,90	77 453,6
0,75	7,01	33 674,3

Glyphosat-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden einzeln derivatisiert, wobei sie danach die oben genannten Konzentrationen der GlyFMOC-Standards aufweisen sollten. Die Chromatogramme dieser Messungen sind im Anhang in Abbildungen 67 - 72 zu finden und deren Peakflächen sowie Retentionszeiten sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Konzentrationen, Retentionszeiten und Peakflächen der Glyderiv-Standards

Konzentration in µg/l	Retentionszeit in min	Peakfläche in µVmin
12	7,36	1 316 205,7
9	7,43	147 150,5
6	7,38	117 175,1
3	7,43	176 494,8
1,5	7,65	140 598,8
0,75	7,74	182 703,5

5.4 Probenaufarbeitung

5.4.1 Futtermittel

Mit Hilfe der Chromabond PS-H⁺ bzw. PS-OH⁻ und der Chromabond HR-XC wurden zwei Mischfutter, Futter A und B, aufgearbeitet. Die HPLC-Methode 1 wurde verwendet, wobei der Gradient bei 7 % Acetonitril startete, die Trennsäule auf 30 °C temperiert wurde und der Puffer einen pH-Wert von 5 aufwies. Die Abbildung 20 zeigt das Chromatogramm der mittels Ionen-Austauscher Kartuschen aufgearbeiteten Futterprobe A. In den messrelevanten Bereichen von 1,5 – 5,5 min und 16,0 – 25,5 min

sind viele Peaks detektiert worden. Doch im Bereich des Standards, der an diesem Tag eine Retentionszeit von 9,5 min zeigte (Abbildung 21), ist bei der Futterprobe kein Peak zu erkennen, obwohl zu diesem Zeitpunkt die Grundlinie sauberer war.

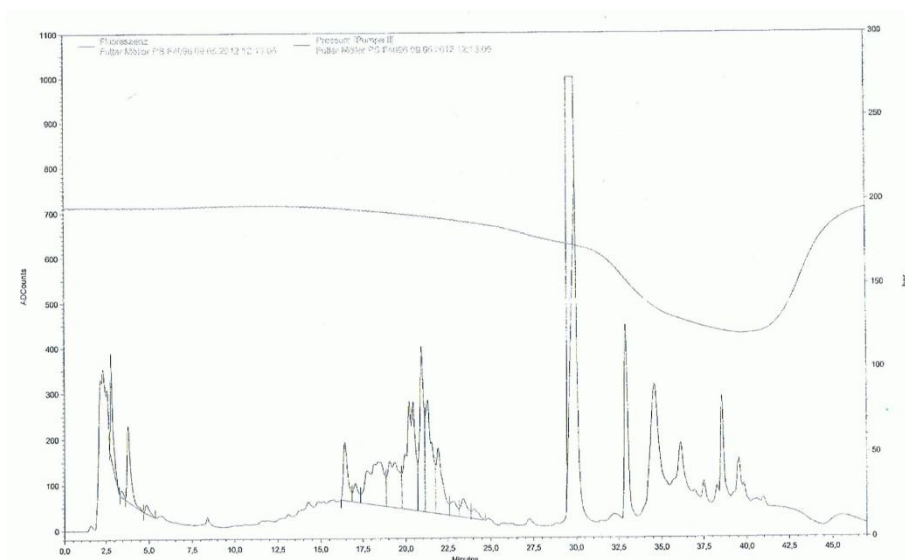


Abbildung 20: Injektion von Futtermittel A; Aufarbeitung über Chromabond PS-H⁺/ PS-OH⁻; Anlage B; Methode 1 (KH₂PO₄-Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

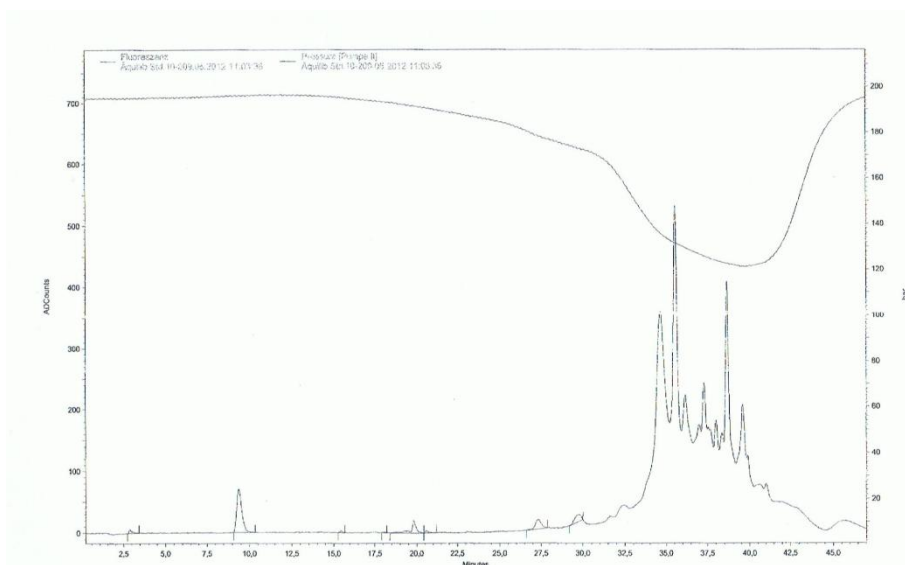


Abbildung 21: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (KH₂PO₄-Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

Die Messung des gleichen Futters aufgearbeitet mit einer Chromabond HR-XC Kartusche ergab das in Abbildung 22 dargestellte Chromatogramm.

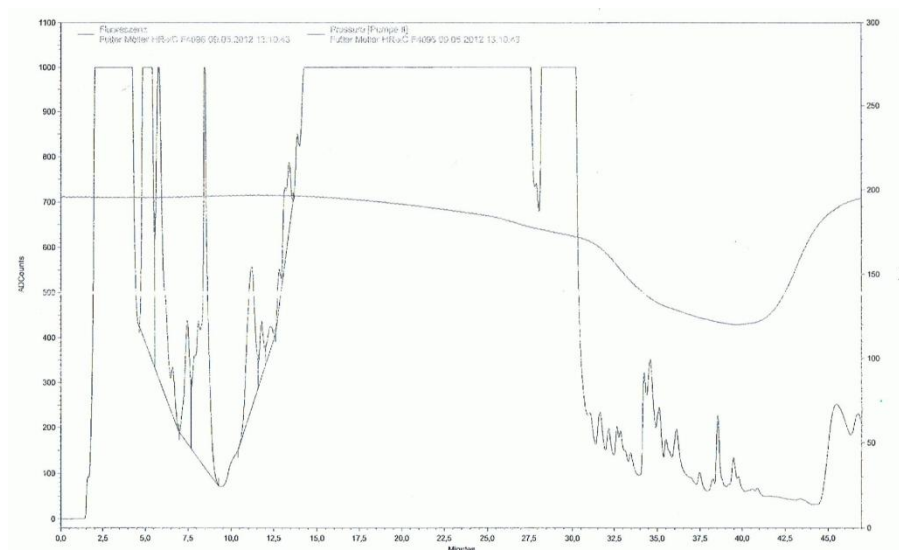


Abbildung 22: Injektion von Futtermittel A; Aufarbeitung über Chromabond HR-XC; Anlage B; Methode 1 (KH_2PO_4 -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 μm Trennsäule

Das Signal war während des gesamten Laufs sehr hoch, sodass kein Peak eindeutig dem Glyphosat zugeordnet werden konnte. Ähnliche Chromatogramme wurden auch bei den Messungen des Futtermittels B erstellt, zu sehen in Abbildung 23 und 24.

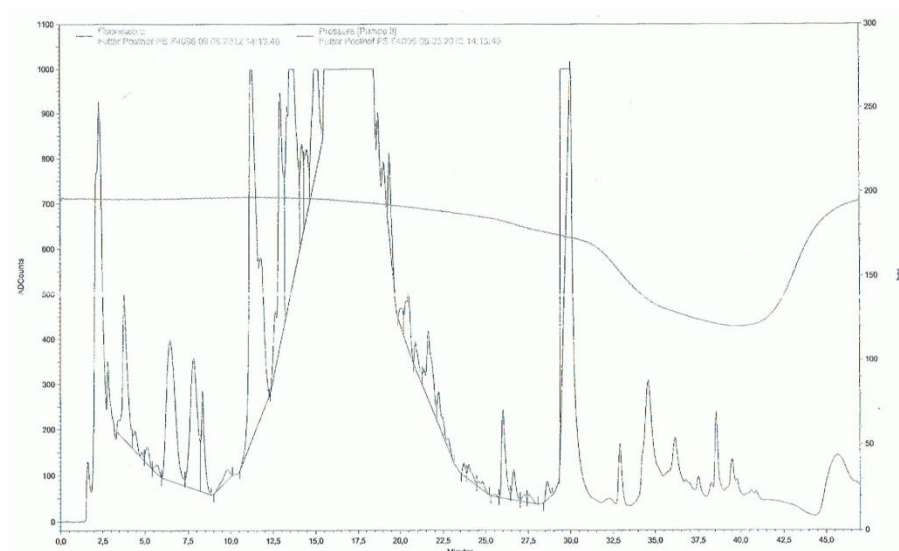


Abbildung 23: Injektion von Futtermittel B; Aufarbeitung über Chromabond PS-H⁺/PS-OH⁻; Anlage B; Methode 1 (KH_2PO_4 -Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 μm Trennsäule

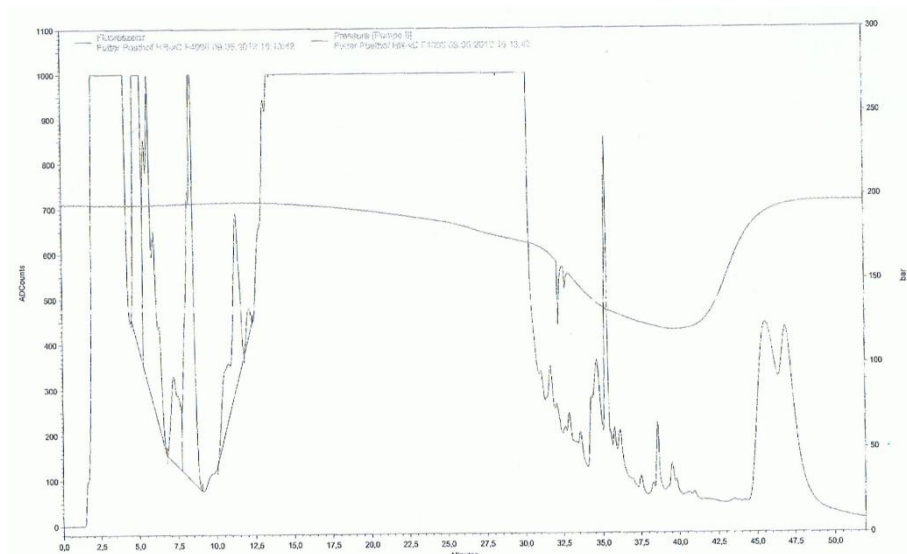


Abbildung 24: Injektion von Futtermittel B; Aufarbeitung über Chromabond HR-XC; Anlage B; Methode 1 (KH₂PO₄-Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

Das Futter A wurde erneut mit den Ionen-Austauschern Chromabond PS-H⁺/ PS-OH⁻ aufgearbeitet, nur wurde es vor der Extraktion mit 40 µg/l Glyphosat versetzt. Das Herbizid konnte eine Stunde im Futter eintrocknen und anschließend wurde das Extraktionsmittel dazugegeben und wie oben beschrieben weiter verfahren. Der Gradient während der HPLC-Messung startete bei 15 % Acetonitril. Der Anteil stieg in den ersten 25 min auf 57 % an und wurde für 2 min gehalten. Die Anfangsbedingungen von 15 % wurden innerhalb von 2 min wieder hergestellt und für 8 min gehalten. Der Gradient ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Säulentemperatur betrug 30 °C und der Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer wies einen pH-Wert von 5 auf.

Tabelle 7: Gradientenverlauf bei der Messung der dotierten Futterprobe

vergangene Zeit in min	ACN-Anteil in %	KH ₂ PO ₄ -Anteil in %
0	15	85
25	57	43
27	57	43
29	15	85
37	15	85

Die Abbildung 25 zeigt die Chromatogramme der dotierten Futterprobe A und des zuvor gemessenen GlyFMOC-Standards mit einer Konzentration von 10 µg/l. Die Retentionszeit des Standards liegt bei 3,1 min und der Peak weist eine Fläche von 239 308 µVmin auf. Das Chromatogramm der Futterprobe zeigt bei 3,2 min ebenfalls einen Peak mit einer Fläche von 352 025 µVmin. Weiterhin wurde bei 2,8 min ein großer Peak mit 855 414 µVmin detektiert und im Bereich von 10,0 - 24,0 min befindet sich eine Peakanhäufung. Bei 30,5 min und 34,0 min sind weitere Signale detektiert worden.

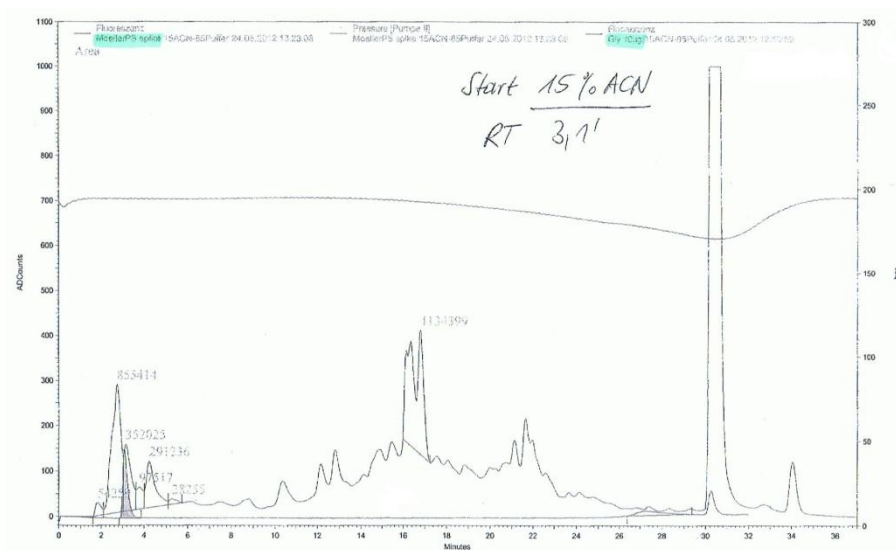


Abbildung 25: Injektion von dotiertem Futter A (40 µg/l) und 10 µg/l GlyFMOC (grau markiert); Anlage B; Methode 1 (15 – 57 % ACN im Gradienten, KH₂PO₄-Puffer pH 5, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

Nach Umstellung auf Methode 3, wurde das dotierte Futter erneut gemessen. Die Abbildung 26 zeigt das dazugehörige Chromatogramm und in Abbildung 27 wurde die gleiche Probe im Verhältnis 1:10 verdünnt und erneut gemessen.

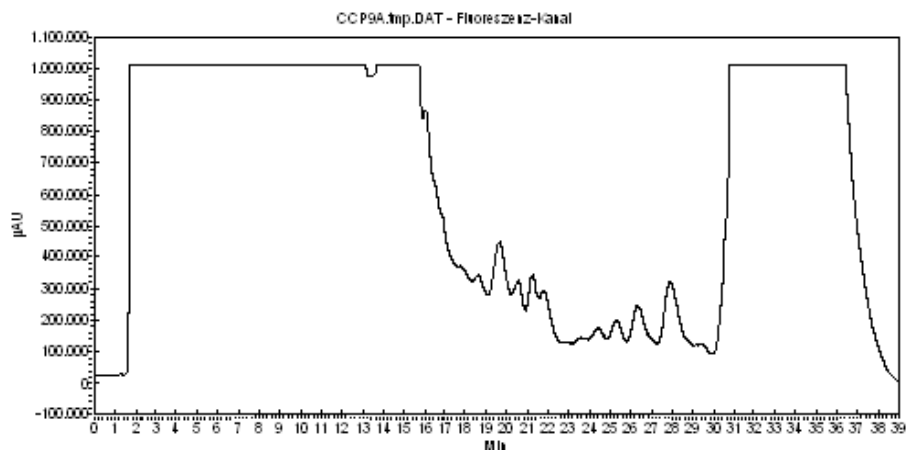


Abbildung 26: Injektion von dotiertem Futter A (40 µg/l); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

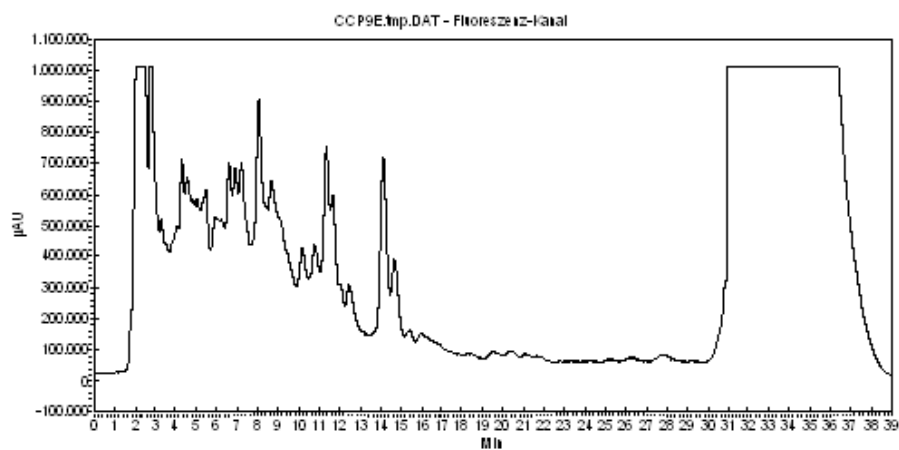


Abbildung 27: Injektion von dotiertem Futter A (40 µg/l, 1:10 verdünnt); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

In beiden Fällen war das Signal im Bereich des Glyphosatpeaks, zwischen 6,0 min und 8,0 min, zu hoch. Kein Peak konnte dem Glyphosat zugeordnet oder genau integriert werden.

Das Futter A wurde mit Kartuschen der Firma Phenomenex aufgearbeitet. Die Abbildung 28 zeigt das Chromatogramm des derivatisierten Eluats aus der Strata X-AW Kartusche. Doch während der anschließenden Flüssig-Flüssig-Extraktion stellte sich keine Phasentrennung ein. Diese wurde durch Zugabe von 7 ml deionisiertem Wasser erzwungen und wie oben beschrieben weiter verfahren. In den ersten 5 min war das Signal noch sehr hoch, aber bei 6,73 min ist ein Peak zu sehen.

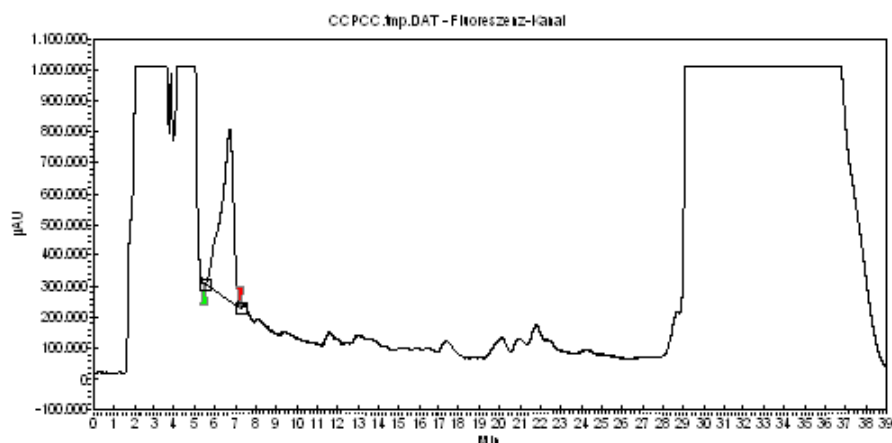


Abbildung 28: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

Das Chromatogramm in Abbildung 29 wurde bei der Messung des Futters aufgenommen, welches über eine Strata C18 Kartusche aufgereinigt wurde. Es sind keinerlei Peaks zu erkennen.

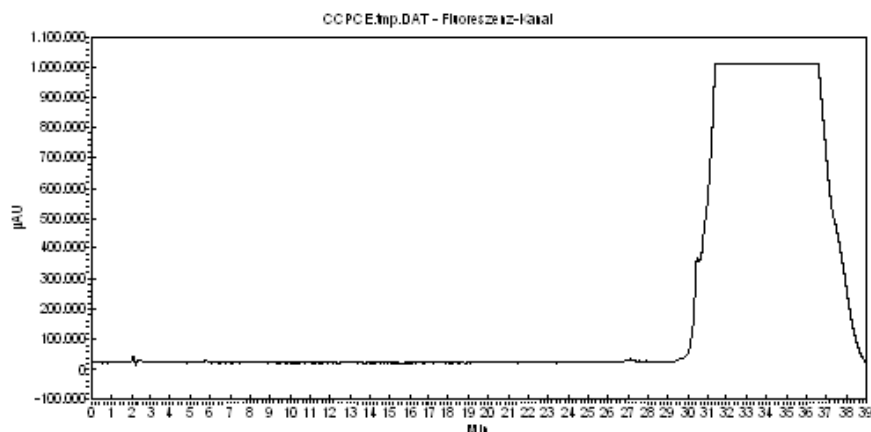


Abbildung 29: Injektion von Futtermittel A; Aufarbeitung über Strata C18; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule

Die Abbildung 30 zeigt erneut eine Messung der über die Strata X-AW aufgearbeiteten Futterprobe, wobei das Eluat vor der Derivatisierung eingetrocknet, in 2 ml Kaliumchlorid-Lösung (1 M) rückgelöst und dann derivatisiert wurde. Das Chromatogramm zeigt ein dauerhaft hohes Signal.

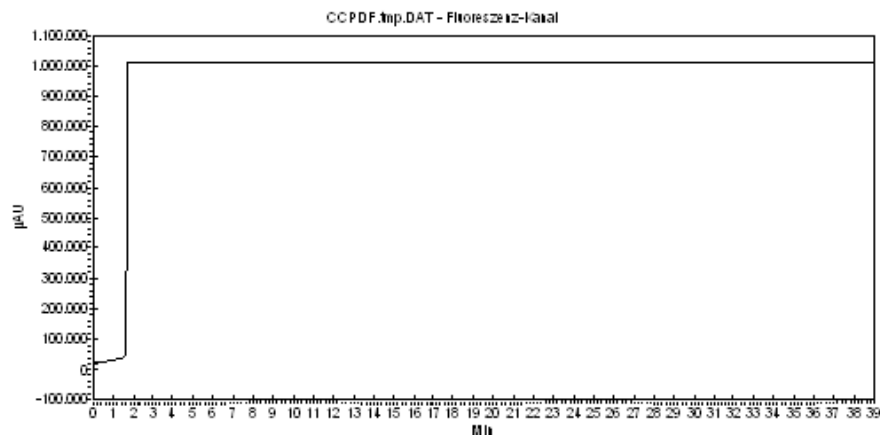


Abbildung 30: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW (Eluat eingetrocknet und in 1 M KCL rückgelöst); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule

Dieses Vorgehen wurde ebenfalls mit dem Eluat der Strata C18 Kartusche durchgeführt. Das derivatisierte Eluat wurde unverdünnt, dargestellt in Abbildung 31, und in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt, siehe Abbildung 32, gemessen. Während der Messung der verdünnten Probe wurde bei ca. 6,6 min ein Peak mit einer Fläche von 78 087,0 µVmin detektiert.

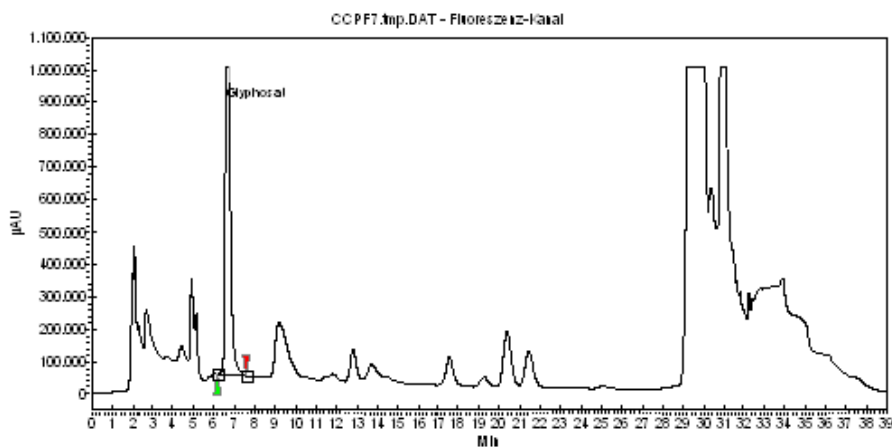


Abbildung 31: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata C18 (Eluat eingetrocknet und in 1 M KCL rückgelöst); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule

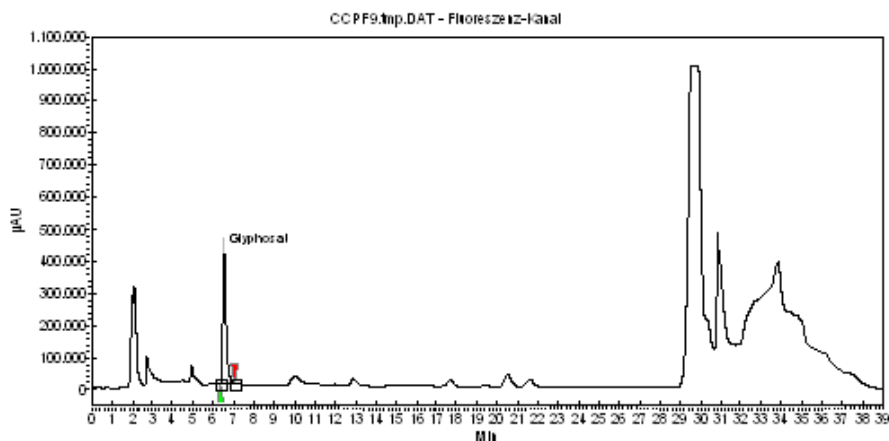


Abbildung 32: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata C18 (Eluat eingetrocknet und in 1 M KCL rückgelöst, 1:5 verdünnt); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min), 5 µm Trennsäule

Als Vergleich zu den Futterproben wurden 2 ml Glyphosat-Lösung eingetrocknet, in 2 ml ammoniakhaltigem Methanol rückgelöst, erneut eingetrocknet und in 2 ml Kaliumchlorid (1 M) wieder aufgenommen. Nach der Derivatisierung wies die Lösung einen Glyphosat-Gehalt von ca. 12,1 µg/l auf. In Abbildung 33 ist das Chromatogramm dargestellt. Es zeigt einen Peak nach 6,51 min mit einer Fläche von 18 609,2 µVmin.

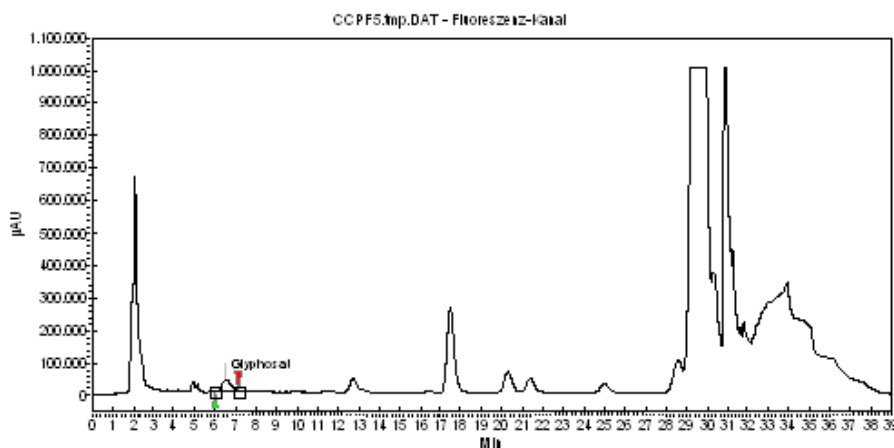


Abbildung 33: Injektion von 12,1 µg/l Glyderiv (eingetrocknet, in Ammoniak-Methanol 5:95 rückgelöst, eingetrocknet und in 1M KCL wieder aufgenommen); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

Die Elution des Futters A von der Strata C18 Kartusche wurde mit Methanol (pH 11,4) getestet. In Abbildung 34 wird das dazugehörige Chromatogramm dargestellt, das viele sehr dicht aufeinander folgende Peaks zeigt.

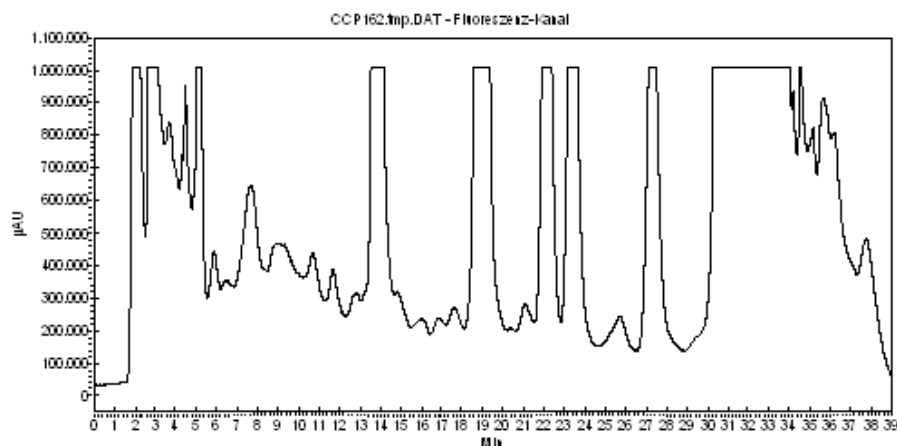


Abbildung 34: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata C18 (Elution mit Methanol pH 11,4); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

Bei den Strata X-AW Kartuschen wurde ebenfalls die Elution mit Methanol (pH 11,4; Abbildung 35), aber auch mit Ameisensäure (Abbildung 36), getestet. Die mit Ameisensäure eluierte Probe wurde als 1:10 Verdünnung gemessen. Entweder ein dauerhaft hohes Signal oder viele dicht hintereinander liegende Peaks wurden detektiert.

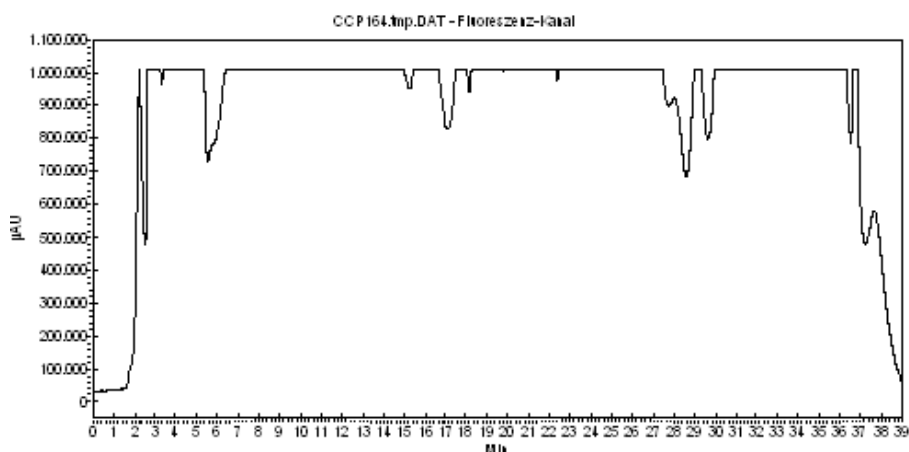


Abbildung 35: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW (Elution mit Methanol pH 11,4); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

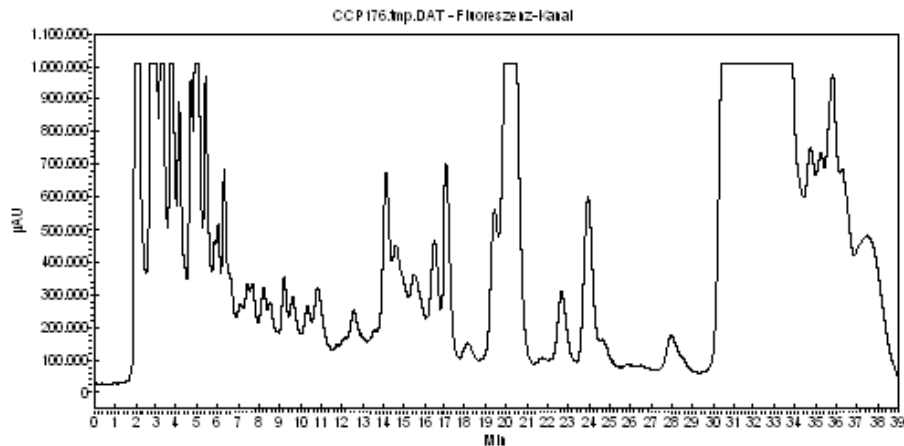


Abbildung 36: Injektion von Futter A; Aufarbeitung über Strata X-AW (Elution mit Ameisensäure); Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

5.4.2 Urinproben

Bei der Messung der verdünnten und derivatisierten Urinprobe A wurde das in Abbildung 37 dargestellte Chromatogramm aufgezeichnet. Die Probe wurde im Verhältnis 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Nach der Derivatisierung wies die Probe noch einen Glyphosat-Gehalt von ca. 7,58 µg/l auf. Die detektierten Peaks liegen im Bereich von 1,0 – 15,0 min sehr dicht beieinander bzw. bilden ein einziges starkes Signal bei 15,0 – 36,0 min. Für diese Messung wurde Methode 1 verwendet, wobei der Gradient bei 7 % Acetonitril startete, die Trennsäule auf 30 °C temperiert wurde und der Kaliumdihydrogenphosphatpuffer einen pH-Wert von 5 aufwies.

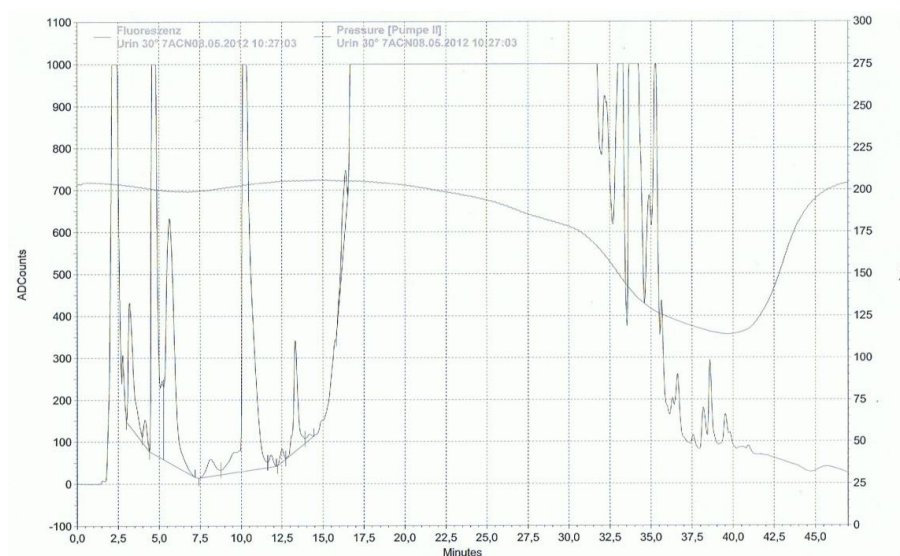


Abbildung 37: Injektion von Urin A (ca. 164 µg/l Glyphosat, 1:20 verdünnt); Anlage A; Methode 1 (30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

Die Urinprobe B wurde im Verhältnis 1:200 verdünnt, derivatisiert und gemessen. Verwendet wurde Methode 1, wobei der Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer auf pH 5 eingestellt und die Trennsäule auf 30 °C erwärmt wurde. Der Gradient begann bei einem Acetonitril-Gehalt von 15 %. Innerhalb von 25 min stieg er auf 57 % an. Diese wurden für 2 min gehalten und nach weiteren 2 min wurden die Anfangsbedingungen von 15 % Acetonitril wiederhergestellt und für 8 min beibehalten. Das Chromatogramm eines zuvor gemessenen GlyFMOC-Standards mit 10 µg/l Glyphosat und das der Urinprobe wurden übereinander gelegt und sind in Abbildung 38 zu sehen. Der Standard weist einen Peak bei 3,2 min auf. Das Chromatogramm der Urinprobe zeigt ebenfalls bei 3,3 min ein Signal. Eine große Anhäufung von dicht beieinander liegenden Peaks ist im Bereich von 11,0 – 33,0 min zu erkennen. Der Abschnitt bis zur 10. Minute weist nur wenige kleine Peaks auf.

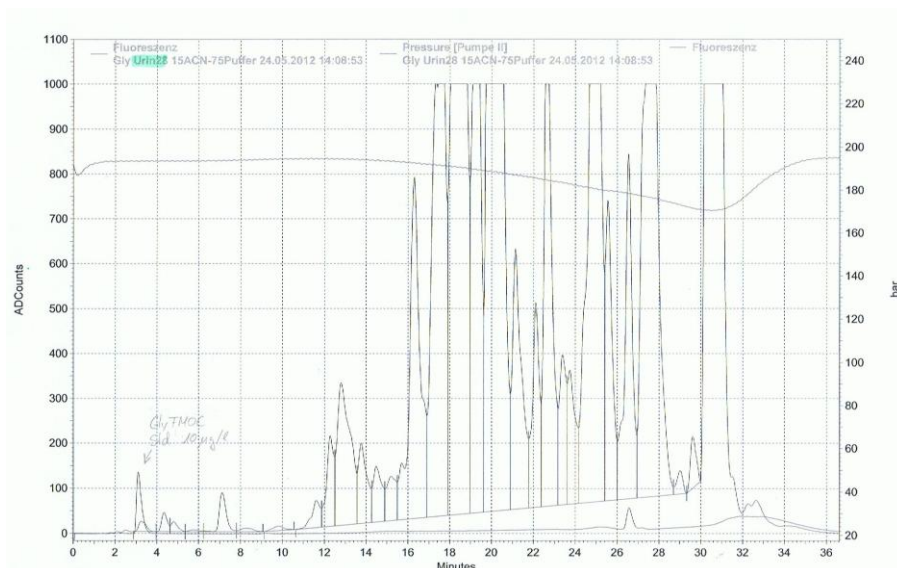


Abbildung 38: Injektion von Urin B (1,35 µg/l Glyphosat, 1:200 verdünnt) und 10 µg/l GlyFMOC; Anlage A; Methode 1 (15 – 57 % ACN im Gradienten, KH₂PO₄-Puffer pH 5; 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

Die gleiche verdünnte Urinprobe wurde vor der Derivatisierung mit 40 µg/l Glyphosat versetzt und anschließend gemessen. Die angewendete Gradientenmethode arbeitete mit einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer der auf pH 5 eingestellt wurde und die Trennsäule wurde auf 30 °C temperiert. Der Gradient begann bei einer Acetonitril-Konzentration von 15 %, wobei sie im Verlauf der Messung statt auf 95 % nur auf 75 % anstieg. Das Chromatogramm in Abbildung 39 zeigt die Messergebnisse der Urinprobe und eines kurz davor gemessenen GlyFMOC-Standards mit einer Konzentration von 10 µg/l. Die Grundlinie des Standards zeigt nach 4,1 min einen Peak,

wobei auch im Chromatogramm der dotierten Urinprobe bei 4,4 min ein ähnlich hoher Peak zu sehen ist. Zwischen 11,5 in und 32,5 min wurde eine Anhäufung von sehr dichten Peaks detektiert.

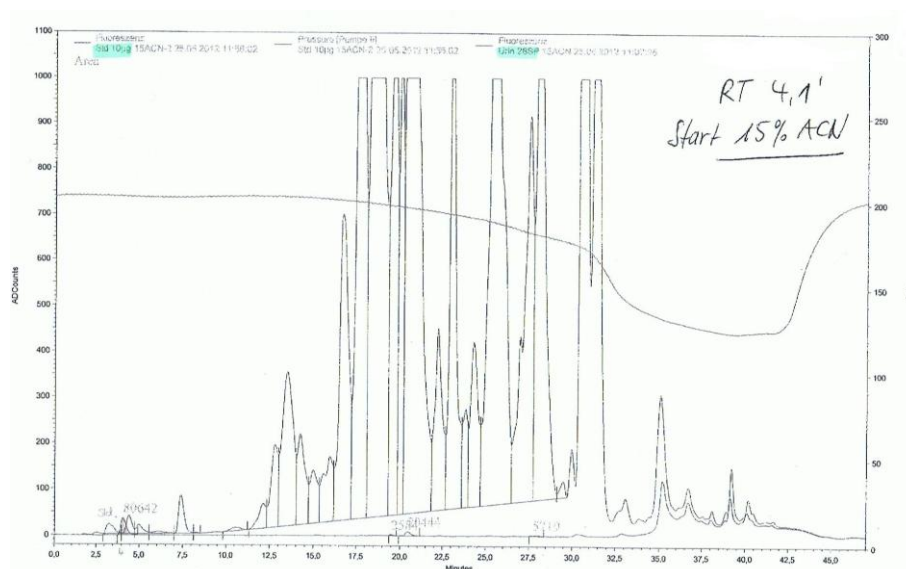


Abbildung 39: Injektion von dotiertem Urin B (40 µg/l); Anlage A; Methode 1 (15 – 75 % ACN im Gradienten; KH₂PO₄-Puffer pH 5; 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule

Bei der Aufarbeitung der Urinprobe C wurde eine Fällungs- und eine Neutralisierungsreagenz der Firma ChromSystems getestet. Die Messung wurde mit Methode 3 durchgeführt. Der Fluss lag bei 0,5 ml/min. Das bei dieser Messung aufgenommene Chromatogramm wird in Abbildung 40 dargestellt und zeigt während der Messung ein dauerhaft hohes Signal, sodass keine einzelnen Peaks ausgemacht werden können.

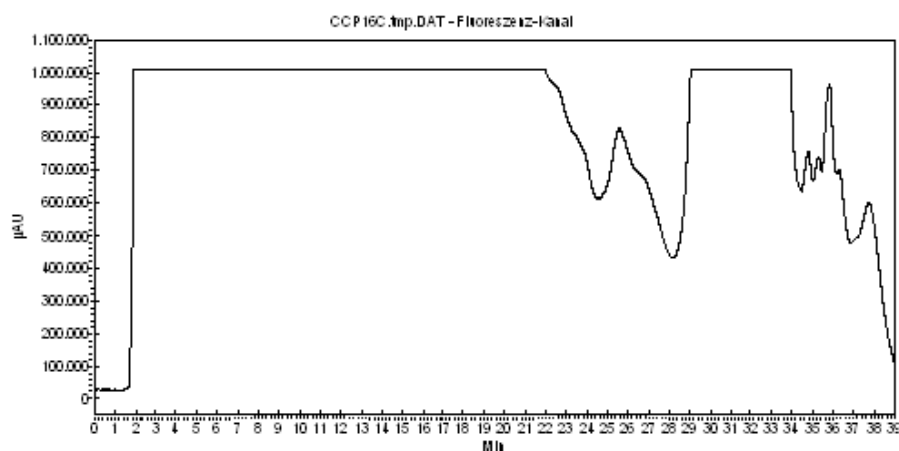


Abbildung 40: Injektion von Urin C; Aufarbeitung mit ChromSystems-Reagenzien; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

Das Vorgehen wurde mit einer Glyphosat-Standard-Lösung analog durchgeführt. Die Glyphosat-Konzentration der Lösung nach dem Derivatisierungsprozess sollte noch ca. 9,5 µg/l betragen. Das in Abbildung 41 gezeigte Chromatogramm wurde bei der Messung dieser Standardlösung aufgenommen. Zu sehen ist ein breiter Peak bei 2,5 min und ein weiterer bei ca. 7,0 min. Kleinere Peaks wurden bei den Retentionszeiten von 5,4 min, 11,6 min und 18,9 min detektiert.

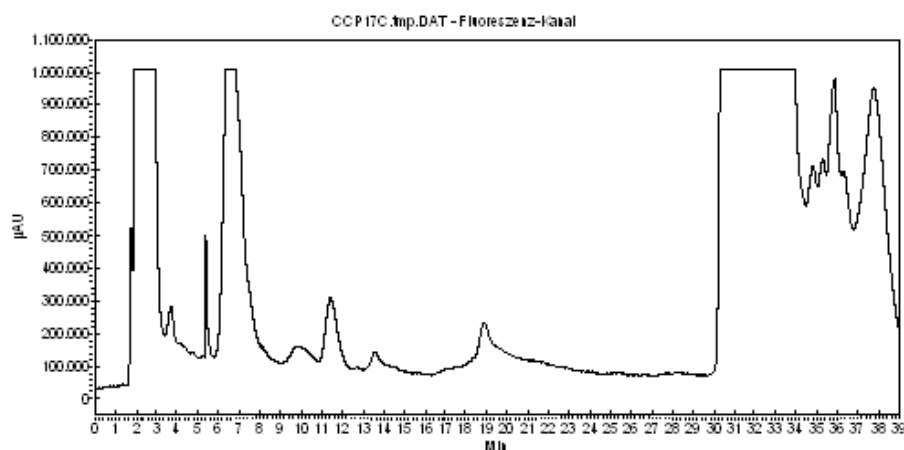


Abbildung 41: Injektion von 9,5 µg/l GlyFMOC; Aufarbeitung mit ChromSystems-Reagenzien; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

6 Diskussion

6.1 Gradientenmethode mit einem Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer

Der Druck von ca. 280 bar entwickelte sich während der Messungen mit Anlage A wahrscheinlich aufgrund des hohen Wasseranteils im Laufmittel und der geringen Partikelgröße der Trennsäule. Zum Arbeiten in der Routine ist er ungeeignet, da der Arbeitsdruck durch das Altern der Säule kontinuierlich steigt und somit recht schnell die Grenzen der zur Verfügung stehenden Anlagen überschreitet.

Wichtig war es zunächst Messungen durchzuführen, ohne dass eine Standardlösung injiziert wurde (Abbildung 4), und dann erst eine Standardlösung zu messen (Abbildung 5). Durch den Vergleich der Chromatogramme kann der Peak des Analyten, also des Glyphosats, identifiziert werden. Daher ist davon auszugehen, dass das nach 16,0 min detektierte Signal durch das Glyphosat-FMOC hervorgerufen wird. Doch bei der folgenden Messung eines kleineren Standards (Abbildung 6), wird das Signal bereits nach 10,2 min detektiert und nicht nach 16,0 min. Eine weitere Möglichkeit den Peak des Analyten zu identifizieren wurde in Abbildung 7 dargestellt. Dort wurden drei verschiedene Standard-Konzentrationen gemessen und die sich verändernde Höhe bzw. Fläche des Peaks zeigt an welcher das Signal des Glyphosat-FMOCs widerspiegelt. Aber die Retentionszeit ist erneut um einige Minuten verkürzt worden. Anfangs lag sie bei 16,0 min, dann bei 10,2 min und nun bei 2,9 min. Nach intensivem Spülen und langem Equilibrieren zeigten sich die nächsten zwei Peaks erst nach 16,5 min und dann nach 14,3 min (Abbildung 8). Um den pH-Wert als mögliche Ursache der schwankenden Retentionszeiten auszuschließen, sind die in Abbildung 9 dargestellten Messungen mit einem auf pH 5 bzw. pH 4 eingestellten Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer durchgeführt worden. Die Signale wurden jeweils nach 3,5 min detektiert. Somit kann der pH-Wert als Ursache ausgeschlossen werden. Der Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer könnte ebenfalls die Retentionszeitverschiebung hervorgerufen haben. Durch den hohen Acetonitril-Anteil im Laufe des Gradienten, könnten Puffersalze in der Trennsäule auskristallisiert sein und somit die Bindungsstellen des Glyphosat-FMOCs blockiert haben. Je mehr Messungen durchgeführt wurden umso mehr Kristalle konnten sich bilden und umso früher wurde das Signal des Glyphosats detektiert. Diese Begründung unterstützt auch die Tatsache,

dass nach intensivem Spülen der Anlage die Peaks für wenige HPLC-Läufe wieder später gemessen wurden. Das Pumpensystem und die online-Mischung der Laufmittelkomponenten kommen ebenfalls als Ursache in Frage. Wird die Konzentration des Laufmittels während der Messung geändert, so vergeht eine gewisse Zeit bis die neue Konzentration erreicht und das Laufmittel im System verteilt ist.

Wird die Peakfläche des 100 µg/l Standards (Abbildung 5) auf 5 µg/l runtergerechnet, so kann sie mit der Peakfläche des 5 µg/l Standards (Abbildung 6) verglichen werden.

$$A_{100\mu\text{g/l}} = 187\,377 \mu\text{Vmin} \rightarrow 187\,377 \mu\text{Vmin} : 20 = 9\,368,85 \mu\text{Vmin}$$

$$A_{5\mu\text{g/l}} = 9\,211 \mu\text{Vmin} \approx 9\,368,85 \mu\text{Vmin}$$

Das Ergebnis zeigt, dass von dem Verhältnis der Flächen auf die Konzentration der Standards geschlossen werden kann. Wird eine Probe mit unbekanntem Glyphosat-Gehalt und ein Standard mit bekannter Konzentration gemessen, so kann mittels Dreisatz der Glyphosat-Gehalt der unbekannten Probe bestimmt werden. Diese Linearität besteht oftmals nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich. Befinden sich die Werte außerhalb des Bereiches besteht keine Linearität mehr und die Konzentration der unbekannten Probe kann nicht ordnungsgemäß bestimmt werden. Das Peakflächenverhältnis der Glyphosat-Standards in Abbildung 7, könnte ebenso bestimmt werden. Diese Peaks werden in Abbildung 42 vergrößert dargestellt.

$$A_{10\mu\text{g/l}} = 172\,472 \mu\text{Vmin} \rightarrow 172\,472 \mu\text{Vmin} : 2 = 86\,236 \mu\text{Vmin}$$

$$A_{5\mu\text{g/l}} = 85\,519 \mu\text{Vmin} \approx 86\,236 \mu\text{Vmin}$$

$$\rightarrow 85\,519 \mu\text{Vmin} : 10 = 8\,551,9 \mu\text{Vmin}$$

$$A_{0,5\mu\text{g/l}} = 17\,762 \mu\text{Vmin} \neq 8\,551,9 \mu\text{Vmin}$$

Die Flächen des 10 µg/l und 5 µg/l Standards weisen ein lineares Verhältnis auf, wobei die Fläche des 0,5 µg/l Standards von dieser Linearität abweicht.

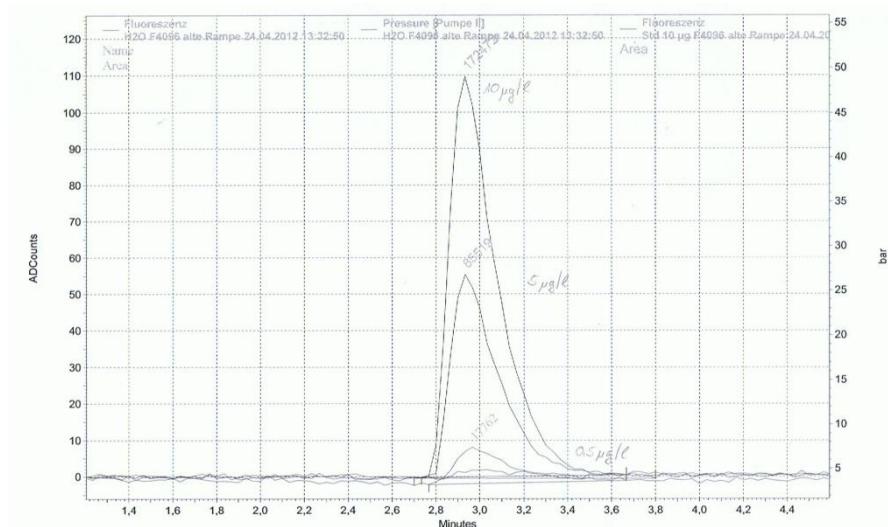


Abbildung 42: Injektion von 10 µg/l, 5 µg/l und 0,5 µg/l GlyFMOC; Anlage A; Methode 1; 5 µm Trennsäule; Vergrößerte Darstellung

Der Vergleich von GlyFMOC-Standard zu derivatisiertem Standard ist in Abbildung 8 dargestellt. Der Peak des derivatisierten Glyphosats (14,33 µg/l) weist mit 432 901 µVmin eine deutlich höhere Fläche auf als die GlyFMOC-Lösung (10 µg/l) mit 159 215 µVmin. Wird die Fläche des GlyFMOC Standards mit 10 µg/l auf 14,33 µg/l hochgerechnet, so wäre eine Fläche von 228 155,1 µVmin zu erwarten gewesen. Gemessen wurde ca. die doppelte Peakfläche, was eventuell durch überschüssiges FMOC-Cl in der Lösung hervorgerufen wurde. Während der Derivatisierung wird ein Überschuss an FMOC-Cl verwendet, damit die Reaktion jedes Glyphosat-Moleküls mit einem FMOC-Molekül schnell ablaufen kann. Dieser Überschuss sollte durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion beseitigt werden, was vermutlich nicht ausreichend erfolgte. Durch Messen der FMOC-Cl-Lösung, die zur Derivatisierung eingesetzt wird, könnte festgestellt werden, ob GlyFMOC und FMOC-Cl bei dieser Methode zu selben Zeit detektiert werden. Auch eine Überlagerung mit einem Störpeak wäre denkbar.

$$A_{10\mu\text{g/l}} = 159\,215\,\mu\text{Vmin} \rightarrow (159\,215\,\mu\text{Vmin} : 10) \cdot 14,33 = 228\,155,1\,\mu\text{Vmin}$$

Bei den Messungen an Anlage B blieben die Retentionszeiten konstant, doch zeigten sich bei gleicher Methode immer wieder Geisterpeaks (Abbildungen 10 und 11, Anhang Abbildungen 47 - 52), die nicht zu beseitigen waren. Im Laufe der Messungen stieg die Anzahl an Geisterpeaks, wobei der bei 12,7 min detektierte Peak mit seiner Nähe zum Glyphosat-Peak ein großes Problem darstellte. Da an dieser HPLC-Anlage im

Routinebetrieb auch andere Methoden laufen, könnten dabei Rückstände in den Kapillaren und Ventilen verbleiben, die bei der Glyphosat-Methode gelöst werden und zu Geisterpeaks führen. Während den Messungen an Anlage A sind keine anderen Methoden gelaufen. Aufgrund der Geisterpeaks wurde eine isokratische Methode getestet.

6.2 Isokratische Methode

Das Ansteigen der Grundlinie in Abbildung 12, geht vermutlich auf eine zu kurze Equilibrierungszeit zurück. Weiterhin konnte kein Peak dem Glyphosat eindeutig zugeordnet werden. Denn die Signale, die bei der Messung des 1 µg/l Standards (Abbildung 12) detektiert wurden, sind neben weiteren Peaks auch in den Chromatogrammen zu sehen, bei denen Laufmittel injiziert wurde (Abbildung 13 und 14). Daher folgte eine Methodenumstellung zurück zu einem Gradienten.

6.3 Gradientenmethode mit einem Phosphorsäure-Laufmittel

Zum Anfang musste die Retentionszeit des Glyphosats bestimmt werden. Dazu wurde ein Standard mit 10 mg/l (Abbildung 15) und einer mit 2 µg/l (Abbildung 16) gemessen. Beide Male wurde ein Peak bei 6,0 min detektiert. Das Signal des 10 µg/l Standards ist, mit einer Fläche von 282 313,2 µVmin, ungefähr fünfmal so stark wie das Signal des 2 µg/l Standards. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um das Glyphosat handelt. Anschließend wurden drei Messungen mit variablem Druck durchgeführt (Abbildung 17 - 19). Dabei wurde getestet, ob der Fluss auf 0,5 ml/min gesenkt werden kann, ohne dass sich die Retentionszeit zu weit nach hinten verschiebt. Die Retentionszeit bei einem Fluss von 0,7 ml/min lag bei 6,8 min, blieb bei einem Fluss von 0,6 ml/min bei 6,8 min und stieg bei 0,5 ml/min auf 7,7 min an. Wäre die Retentionszeit auf 15 – 20 min gestiegen, dann würde die Messung in der späteren Routine sehr viel Zeit in Anspruch nehmen und nur wenige Proben könnten an einem Tag gemessen werden. Diese minimale Retentionszeitverschiebung lässt ebenfalls eine spätere Messzeitoptimierung zu. Der dadurch verringerte Arbeitsdruck ist auch schonender für die HPLC-Anlage. Aufgrund dessen wurde der Fluss von 0,5 ml/min für weitere Messung beibehalten. Im Gegensatz zu Methode 1 an Anlage A, sind die

Retentionszeiten weitgehend konstant geblieben. Bei den in Abbildungen 53 – 60 (Anhang) aufgeführten Messungen variierte sie zwischen 6,8 min und 7,9 min. Die Messung des GlyFMOC-Standards mit einer Konzentration von 0,75 µg/l wurde dazu genutzt, um das Verhältnis des Grundlinienrauschens zum gemessenen Peak zu bestimmen. Das entsprechende Chromatogramm wird in Abbildung 43 dargestellt. Neben dem Glyphosat-Peak wurden jeweils vier kleine Ausschläge der Grundlinie vor und nach dem Glyphosat integriert und die Flächen in Tabelle 8 zusammengefasst.

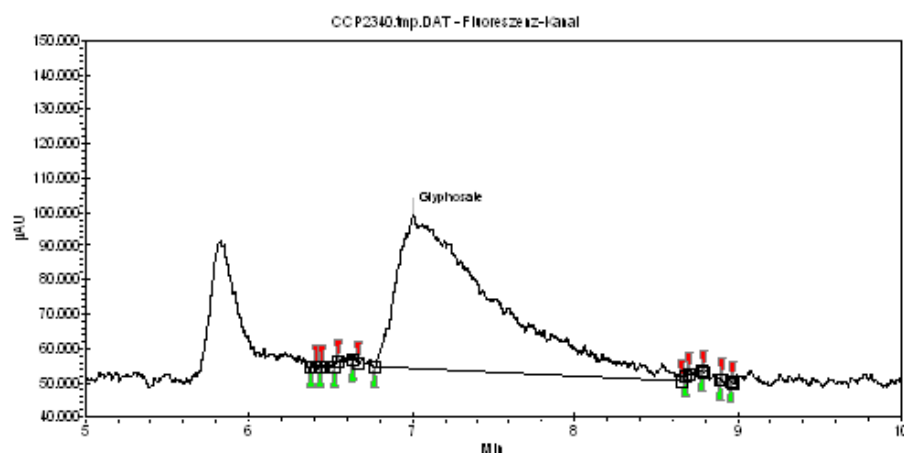


Abbildung 43: Injektion von 0,75 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

Tabelle 8: Vergleich der Flächen von Grundlinien-Peaks und dem Peak eines 0,75 µg/l GlyFMOC-Standards

Peak	Höhe in µVmin
Grundlinien-Peak 1	1 836,8
Grundlinien-Peak 2	1 676,7
Grundlinien-Peak 3	1 612,8
Grundlinien-Peak 4	1 530,6
Glyphosat	44 731,0
Grundlinien-Peak 5	1 623,1
Grundlinien-Peak 6	998,0
Grundlinien-Peak 7	1 565,1
Grundlinien-Peak 8	1 587,4

Im Durchschnitt wiesen die Grundlinien-Peaks eine Höhe von 1 553,81 µVmin auf. Der Standard mit einer Höhe von 44 731,0 µVmin ist 28,79mal größer. „In der chromatographischen Praxis gelten zumeist das zwei- bis dreifache Rauschen als Nachweisgrenze und das fünf- bzw. Neun- bis zehnfache Rauschen als

Bestimmungsgrenze.“ [Kromidas, Stavros; URL-12]. Dieser Standard liegt zwar deutlich über dem Rauschen der Grundlinie, doch ist zu bedenken, dass hier ein reiner Standard gemessen wurde. In natürlichen Proben mit Matrixeinfluss kann dieses Verhältnis ganz anders ausfallen.

Um die Linearität der Konzentrationen zur Signalstärke zu überprüfen, wurde eine Reihe von Standards (12 µg/l; 9 µg/l; 6 µg/l; 3 µg/l; 1,5 µg/l und 0,75 µg/l; Anhang Abbildungen 61 - 66) gemessen. In Abbildung 44 wurden die Peakflächen und Standard-Konzentrationen gegeneinander aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß von 0,9936 ist ein Hinweis auf eine in diesem Konzentrationsbereich vorliegende Linearität. Die Glyphosat-Konzentration einer unbekannten Probe könnte also anhand dieses Graphen ermittelt werden. Weist das Chromatogramm einer solchen Probe einen Glyphosat-Peak auf, so könnte die Konzentration des Glyphosats durch Auftragen der Peakfläche abgelesen werden. Es muss aber beachtet werden, dass während der Aufarbeitung einer Probe, diese verdünnt oder auch aufkonzentriert werden kann. Dieser Faktor müsste in die Berechnung mit einfließen. Diese Bestimmung sollte am besten nicht mit einer GlyFMOC-Lösung erfolgen sondern mit vor Ort derivatisierter Glyphosat-Lösung da diese unter den gleichen Bedingungen durchgeführt würde, wie die Probe selbst. Umgebungseinflüsse, wie z.B. Klima würden sowohl auf den Standard als auch auf die Probe wirken und die Bestimmung wäre genauer.

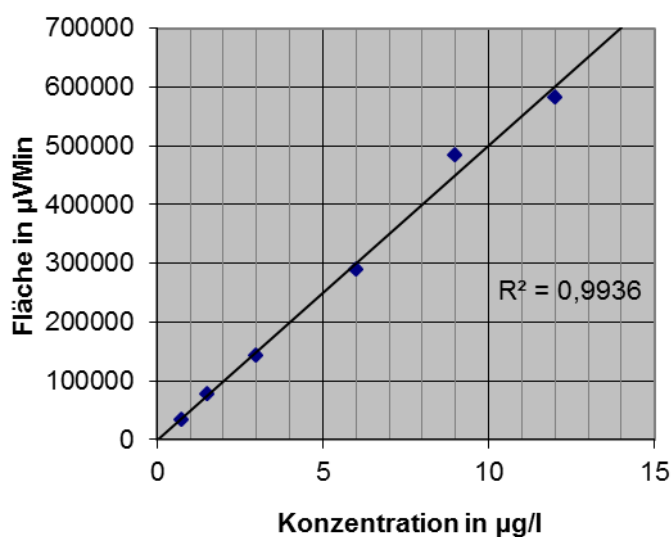


Abbildung 44: Konzentrationen der GlyFMOC-Standards aufgetragen gegen die Peakfläche

Um die Linearität nicht nur in Zusammenhang mit der HPLC-Anlage nachzuweisen, sondern auch den Derivatisierungserfolg zu überprüfen, wurden Glyphosat-Lösungen hergestellt und derivatisiert. Am Ende des Verfahrens sollten sie ungefähr die Konzentrationen der oben angegebenen GlyFMOC Standards aufweisen. Die Chromatogramme dieser Messungen sind im Anhand Abbildungen 67 – 72 aufgeführt. Auch hier wurden die Standard-Konzentrationen gegen die entsprechenden Peakflächen aufgetragen und in Abbildung 45 dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß von 0,5024 zeigt jedoch keine Linearität. Die Ursache von diesem Ergebnis könnten Verdünnungsfehler während der Herstellung dieser Standardlösungen sein, aber der Derivatisierungsprozess an sich könnte ebenfalls nicht optimal abgelaufen sein. Um sicher zu gehen, müsste dieser Versuch wiederholt werden, falls wieder ein solches Ergebnis eintritt, so müsste die Derivatisierung überarbeitet werden.

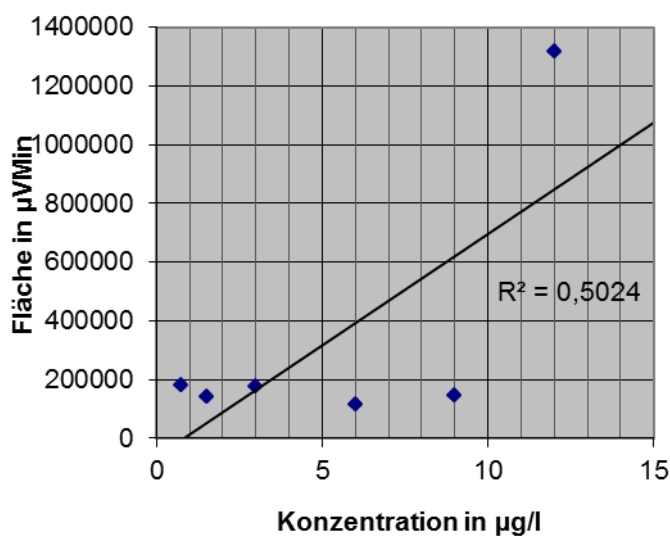


Abbildung 45: Konzentrationen der Glyphosat-Standards aufgetragen gegen die Peakfläche

6.4 Futtermittel

Die Futter A und B wurden ebenfalls von zwei unabhängigen Laboren mittels HPLC untersucht. Das Labor A fand einen Glyphosat-Gehalt von 950 µg/kg im Futter A und 920 µg/kg im Futter B. Im Futter A wurde durch Labor B ein Glyphosat-Gehalt von 160 µg/kg gemessen und im Futter B 60 µg/kg.

Die Aufarbeitung über die Chromabond PS-H⁺/PS-OH⁻ (Abbildung 20 + 23) erweist sich als effektiver als mit der Chromabond HR-XC Kartusche (Abbildung 22 + 24), da

in den Chromatogrammen des Futters A sowie des Futters B weniger Interferenzen zu sehen sind. Aufgrund der sich verändernden Retentionszeit bei dieser Gradientenmethode wurde vor den Futterproben ein GlyFMOC Standard gemessen, um die Retentionszeit zu bestimmen. Das Glyphosat wurde nach 9,5 min detektiert. Nur das Chromatogramm der Futterprobe A, aufgearbeitet mittels Ionen-Austauscher Säulen, weist zu diesem Zeitpunkt keine störenden Matrix-Peaks auf, wobei der Glyphosat-Gehalt bestimmt werden könnte. Da aber nach 9,5 min kein Signal detektiert wurde, könnte davon ausgegangen werden, dass das Futter keine Herbizidrückstände enthält. Die zwei unabhängigen Labore hingegen, haben einen Glyphosat-Gehalt nachgewiesen. Eine Wiederholung dieser Messungen könnte bei der Ursachenforschung helfen, doch aufgrund der Probleme mit dieser Gradientenmethode, wurde davon abgesehen. Die Futterprobe A wurde für den Dotierungsversuch gewählt, da es, nach der Aufarbeitung über die Ionen-Austauscher Säulen, bei der vorherigen Messung am wenigsten störende Matrixbestandteile im Chromatogramm aufwies. Doch das in Abbildung 25 dargestellte Chromatogramm zeigt im Bereich des Glyphosats, hier ca. 3,1 min, mehrere Peaks. Wenn davon ausgegangen wird, dass das Futter vor der Dotierung kein Glyphosat enthielt, dann müsste wenigstens ein Peak mit vierfacher Fläche des Standardpeaks detektiert werden, also mit ca. 957 232 μVmin . Sowohl der Peak bei 2,8 min mit 855 414 μVmin als auch der bei 3,2 min mit 352 025 μVmin besitzen eine zu geringe Fläche. Es muss auch berücksichtigt werden, dass während der Probenvorbereitung nicht unbedingt das gesamte Glyphosat extrahiert wird bzw. kann auch ein Teil in den Ionen-Austauschern gebunden werden. Die gleiche Probe wurde nach der Umstellung auf Methode 3 erneut gemessen. Sowohl in Abbildung 26 als auch bei der 1:10-Verdünnung in Abbildung 27 sind zu viele durch Matrixbestandteile hervorgerufene Signale detektiert worden, sodass das Glyphosat im Bereich von 6,8 min bis 7,8 min nicht identifiziert werden kann. Durch die geänderte Laufmittelzusammensetzung, könnten die Signale verstärkt worden sein.

Während der Aufreinigung über die Strata X-AW Kartuschen wurden deutlich mehr Matrixbestandteile aus der Probe entfernt, was das Chromatogramm in Abbildung 29 zeigt. Der Peak bei 6,73 min könnte vom Glyphosat stammen, doch kurz vorher ist das Signal schon sehr hoch, was Einfluss auf die Fläche des Peaks hat. Er könnte auch Signale von Matrixbestandteilen beinhalten. Ein Hinweis darauf ist die nicht konstant

ansteigende Grundlinie, die vor dem Maximum des Peaks einen Knick aufweist. Das Chromatogramm der Futterprobe A in Abbildung 29, die über die Strata C18 Säule aufgearbeitet wurde, zeigt keinerlei Signale. Das Fehlen von Peaks, könnte ein Hinweis auf eine nicht oder nur fehlerhaft abgelaufene Derivatisierung sein. Während der Flüssig-Flüssig-Extraktion musste die Phasentrennung erzwungen werden, eventuell stören Bestandteile des Elutionsmittels auch die Derivatisierungsreaktion. Hinweise darauf gab auch Frau Dr. Barbara Hauser der Landesanstalt für Landwirtschaft, Forsten und Gartenbau. In Ihrer Präsentation zum Thema „Entwicklung einer LC-Ms/MS Methode zur Bestimmung von Glyphosat und Ampa in Boden“ weist Sie darauf hin, dass Ammoniak schon in geringem Maße, das Signal des Glyphosats unterdrücken kann [URL-5]. Aufgrund des im Elutionsmittel enthaltenen Ammoniaks wurden die Eluate der Strata C18 und Strata X-AW vor der Derivatisierung eingetrocknet und in Kaliumchlorid-Lösung (1 M) wieder aufgenommen. Das Eluat der Strata X-AW, enthielt noch so viele Matrixbestandteile, die derivatisiert wurden, dass das Chromatogramm in Abbildung 30 ein dauerhaft hohes Signal zeigt. Die Aufreinigung des Extraktes ist nicht ausreichend, wobei die Auswirkungen des ammoniak-haltigen Elutionsmittel nicht abschätzbar sind. Nach der Prozedur des Eintrocknens scheint die Derivatisierung des Strata C18-Eluats erfolgreicher abgelaufen zu sein, da das zugehörige Chromatogramm in Abbildung 31 und verdünnt in Abbildung 32 Peaks aufweist. Da das Signal im Bereich des Glyphosats stärker ist, als das detektierbare Maximum des Detektors, wurde die Probe im Verhältnis 1:5 verdünnt und erneut gemessen (Abbildung 32). Zum Vergleich wurde ebenfalls ein Glyphosat-Standard mit dem ammoniak-haltigen Elutionsmittel auf ca. 12,1 µg/l verdünnt, eingetrocknet, in Kaliumchlorid-Lösung (1 M) wieder aufgenommen und anschließend derivatisiert (Abbildung 33). Zu erwarten war eine Peakfläche von über 400 000,0 µVmin, doch dieser Peak wies nur eine Fläche von 18 609,2 µVmin, ein Bruchteil von dem was er haben sollte. Dies bestätigt die Vermutung, das Ammoniak die Bildung des Glyphosat-FMOC-Derivats unterdrückt. Demzufolge ist das Signal des Strata X-AW-Eluats in Abbildung 32 wahrscheinlich auch um ein vielfaches kleiner detektiert worden, als es wirklich ist. Weiterhin wurden andere Elutionsmittel getestet. Um den Ammoniak zu vermeiden wurde der pH-Wert des Methanols mit Natronlauge auf 11,4 eingestellt. Diesen pH-Wert wies auch das ammoniakhaltige Elutionsmittel auf. Doch

sowohl bei der Strata X-AW als auch bei der Strata C18 wurden viele gebundene Matrixbestandteile mit dem Glyphosat co-eluiert, die wiederum die Messung störten, (Abbildung 34 und 35). Auch die Elution der Strata X-AW mit Ameisensäure brachte ein ähnliches Ergebnis, wie die Abbildung 36 zeigt. Ameisensäure als Elutionsmittel der Strata C18-Kartusche wurde nicht getestet, da laut Hersteller das enthaltene Polymer dadurch geschädigt werden würde.

6.5 Urinproben

Die Urinproben vor der Derivatisierung nur zu verdünnen reicht bei der HPLC-Messung nicht aus, wie die Abbildungen 37 und 38 zeigen. In den Urinproben sind vermutlich Substanzen enthalten, die ebenfalls mit FMOC-Cl reagieren und während der Messung zu störenden Signalen führen. Das FMOC-Cl reagiert nicht spezifisch mit dem Glyphosat sondern mit der darin enthaltenen Aminogruppe. Somit werden z.B. Proteine oder Harnstoff ebenfalls derivatisiert. Aber auch im Urin enthaltene Stoffe können, ohne eine Derivatisierung während der Fluoreszenzmessung detektiert werden, weil sie selber über chromophore Eigenschaften verfügen. Je weiter die Proben verdünnt werden umso weniger störende Peaks werden gemessen, dabei wird aber auch das Glyphosat verdünnt. Liegen nur kleine Mengen im Urin vor, so könnten diese nach der Verdünnung nicht mehr detektierbar sein. Die Grundlinie bei Messung der zweiten Urinprobe (Abbildung 38) zeigte erst nach 11,0 min ein ansteigendes Signal. Da die Retentionszeit bei dieser Methode starken Schwankungen unterworfen ist, wurde vorher ein Standard gemessen um die Retentionszeit festzustellen. Sie lag bei 3,2 min und auch das Chromatogramm der Urinprobe weist zu dieser Zeit einen Peak auf, der vom Glyphosat stammen kann. Daher wurde die Urinprobe ein zweites Mal gemessen. Vor der Derivatisierung wurde die Urinprobe mit 40 µg/l Glyphosat versetzt. Das Chromatogramm in Abbildung 39 zeigte zwar einen Peak fast zur selben Zeit wie die Messung des Standards, also bei 4,4 min, nur ist dieser nicht viel höher. Der Standard hatte eine Konzentration von 10 µg/l. Im Chromatogramm der Urinprobe wurde also ein Peak mit der vierfachen Höhe erwartet, der sich aber nicht zeigte. Eine Ursache dafür, wäre die sich verändernde Retentionszeit. Der Glyphosat-Peak im Chromatogramm der Urinprobe könnte auch eine andere Retentionszeit aufweisen als der Standard. Es könnten aber auch Inhaltsstoffe des Urins die Derivatisierung des Glyphosats gestört

haben. Da die Verdünnung des Urins nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde ein Fällungsreagenz mit zugehöriger Neutralisierungslösung der Firma ChromSystems getestet. Normalerweise werden diese Lösungen für den Nachweis von Vitamin B1 und B6 zur Fällung von Proteinen eingesetzt. Um auszuschließen, dass diese Substanzen Probleme bei der Derivatisierung hervorrufen, wurde neben der Urinprobe auch ein Glyphosat-Standard mit den Reagenzien von ChromSystems aufgearbeitet. Im Chromatogramm der so aufgearbeiteten Urinprobe (Abbildung 40) zeigte sich trotzdem ein dauerhaft hohes Signal, hervorgerufen durch störende Matrixbestandteile. Obwohl die Derivatisierung des Glyphosat-Standards ohne Probleme ablief, zeigt das Chromatogramm (Abbildung 41) im Bereich der Glyphosat-Retentionszeit von 6,8 – 7,8 min einen sehr hohen und breiten Peak. Nach der Derivatisierung sollte der Standard eine Glyphosat-Konzentration von ca. 9,5 µg/l aufweisen, das Signal ist für diese Konzentration jedoch viel zu stark. Die Rückstände der Reagenzien von ChromSystems könnten in der Standard-Lösung zurückgeblieben sein und zu einem Peak bei 7,0 min führen, der den Glyphosat-Peak überlagert. Aber auch eine für die Derivatisierungsreaktion förderliche Wirkung der ChromSystems-Reagenzien ist denkbar. Die reinigende Wirkung der Reagenzien reicht nicht aus, um Urinproben von störenden Inhaltsstoffen zu befreien.

7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine wichtige Grundlage für die weiteren Untersuchungen in Form einer stabilen HPLC-Methode zum Nachweis von Glyphosat gelegt. Die Methode zur Derivatisierung von glyphosathaltigen Lösungen sollte überprüft werden. Die erstellte Glyderiv-Standardkurve zeigte keine lineare Abhängigkeit der Peakfläche von der Konzentration des Standards. Wenn sich bei der Wiederholung kein anderes Ergebnis zeigt, sollten andere Derivatisierungsreagenzien, wie OPA oder Tosylchlorid in Erwägung gezogen werden.

Für die Aufarbeitung von Futtermitteln und Urinproben könnten weitere Polymere getestet werden. Glyphosat ist bekanntlich ein schwer nachzuweisender Stoff, für welchen noch keine Immunoaffinitätsäulen angeboten werden.

Die Firma PolyIntell hat eine neue Art von Kartuschen entwickelt. Diese enthalten ein Polymer, in das der Analyt eingepreßt wurde. Die spezifische Bindung wird über ebenfalls im Polymer eingeschlossene Monomere realisiert. Die Bindung erfolgt nicht nur über die spezielle Struktur des Analyten, sondern auch über funktionelle Gruppen.

Die zu analysierende Substanz bildet zusammen mit den Monomeren eine Schablone, wie in Abbildung dargestellt. Das Polymer umschließt diese Verbindung und behält nach dem Herauslösen des Analyten dessen Form, wobei die Monomere im Polymer zurückbleiben. [URL-13]

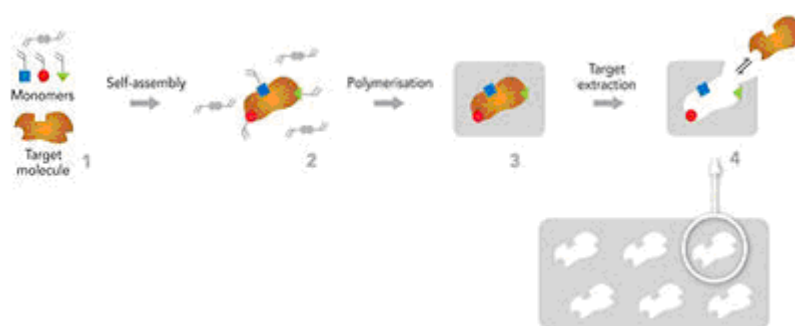


Abbildung 46: Schematisch dargestellter Herstellungsprozess einer Affinimip Kartusche [URL-13]

Solche Affinimip Kartuschen könnten die selektive Anreicherung von Glyphosat aus schwierigen Matrices ermöglichen. Doch die Entwicklung von Affinimip Kartuschen zur Aufkonzentrierung von Glyphosat ist noch nicht abgeschlossen.

8 Zusammenfassung

Das weltweit am häufigsten verwendete Herbizid Glyphosat wurde erstmals von der Firma Monsanto 1974 vertrieben [URL-1; URL-4]. Heute wird es unter vielen Namen verkauft, wobei das bekannteste Produkt Roundup heißt [Auling, 2009; Khrolenko u. Wieczorek, 2005]. Durch die Fähigkeit das Enzym EPSPS im Stoffwechsel aller Pflanzen zu inhibieren [da Silva et al, 2011; Sun et al, 2010; Stalikas u. Konidari, 2001] und sie damit abzutöten, wird Glyphosat in vielen Bereichen, wie z.B. in der Land- und Forstwirtschaft, als Breitbandherbizid eingesetzt [Hanke et al, 2008; Lee et al, 2002]. Da dieser Stoffwechselweg in Tieren nicht vorhanden ist, wird von einer geringen Toxizität ausgegangen [URL-1; URL-2; Anadón et al, 2009]. Die genaue Wirkung von Glyphosat im Körper ist nicht geklärt, aber die Aufnahme kann zu Durchfall und Erbrechen, in schweren Fällen auch zu Krämpfen und zum Kreislaufkollaps führen [Miller et al, 2010; Roberts et al, 2010]. Daher ist der Nachweis des Herbizids in landwirtschaftlichen Erzeugnissen wichtig. Aber auch der Nachweis in Urin zu Diagnosezwecken ist von Bedeutung, da Glyphosat fast vollständig und unverändert über den Urin ausgeschieden wird [Miller et al, 2010]. Verschiedene Methoden Glyphosat mittels HPLC nachzuweisen wurden getestet. Zunächst wurde mit einer Glyphosat-FMOC-Lösung als Standardlösung gearbeitet, aber auch die Derivatisierung von reinem, in Wasser gelöstem, Glyphosat wurde durchgeführt und das Reaktionsprodukt analysiert. Die Gradienten-Methode mit dem kaliumdihydrogenphosphathaltigen Laufmittel erwies sich als nicht zuverlässig, da die Retentionszeiten stark schwankten. Auch der Versuch einer isokratischen Messung war nicht erfolgreich. Der Glyphosat-Peak konnte in den Chromatogrammen nicht identifiziert werden. Stabile Retentionszeiten wurden erst mit der Gradientenmethode erreicht, die verdünnte Phosphorsäure als Laufmittelkomponente einsetzt. Der in der Applikation von Küsters und Gerhartz angegebene Fluss von 0,7 ml/min [Küsters u. Gerhartz, 2010] wurde auf 0,5 ml/min gesenkt, um den Arbeitsdruck zu verringern. Das Signal des Glyphosat-FMOC wurde konstant nach 6,8 min bis 7,8 min detektiert. Die Peakflächen sind linear abhängig von der GlyFMOC-Konzentration im Bereich von 0,75 µg/l bis 12 µg/l. Damit wurde die Etablierung einer stabilen HPLC-Methode zum Nachweis von Glyphosat erreicht.

Nur die Aufarbeitung von Futtermitteln und Urinproben gestaltete sich schwierig, da viele Matrixbestandteile in der Probe zurückblieben und zu Störungen während der Messungen führten.

9 Summary

The mostly used herbicide glyphosate was first sold by Monsanto in 1974 [URL-1; URL-4]. Today it's sold under many names, but the most famous product is Roundup [Auling, 2009; Khrolenko a. Wiecezorek, 2005]. Through the ability to inhibit the enzyme EPSPS in the metabolism of all plants and thus to kill them [da Silva et al, 2011; Sun et al, 2010; Stalikas a. Konidari, 2001], glyphosate is used as broad-spectrum herbicide in various fields, such as agriculture and forestry [Hanke et al, 2008; Lee et al, 2002]. Since the absence of this pathway in animals, it's assumed that glyphosate have a low toxicity [URL-1; URL-2; Anadón et al, 2009]. The exact effect of glyphosate in the body of animals is unknown, but the ingestion can cause diarrhoea and vomiting, in severe cases also convulsions and collapse [Miller et al, 2010; Roberts et al, 2010]. Therefore, the detection of the herbicide in agricultural products is important. But the evidence in urine for diagnostic purpose is also significant because glyphosate is excreted almost entirely and unchanged with the urine [Miller et al, 2010].

Various methods were tested to detect glyphosate by HPLC. Initially worked with a glyphosate-FMOC solution as standard solution, but also the FMOC derivatisation of pure glyphosate dissolved in water was performed and the reaction product analysed. The method using a mobile phase containing potassium dihydrogen phosphate was found to be unreliable, since the retention times varied greatly. Even the isocratic measurement was not successful. In chromatograms the glyphosate peak could not be identified. Stable retention times were achieved only with the gradient method using diluted phosphoric acid as mobile phase component. The flow of 0,7 ml/min [Küsters a. Gerhartz, 2010] specified in the application of Küsters and Gerhartz was reduced to 0,5 ml/min to drop the operating pressure. The signal of glyphosate-FMOC was consistently detected after 6,8 – 7,8 min. The peak areas are linearly dependent from the GlyFMOC concentration in the range from 0,75 µg/l to 12 µg/l. Thus, the establishment of a stable HPLC method for the detection of glyphosate was been achieved.

Only the clean-up of feed and urine samples was not successful, too many matrix components remained in the sample, leading to disturb the measurement.

Literaturverzeichnis

Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M. R. ; Martínez, M. A.; Castellano, V. J.; Martínez, M.; Martín, M. T.; Nozal, M. J.; Bernal, J.L. (2009) *Toxicogenetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats*. Toxicology Letters. 190:91 – 95

Auling, Ragne (2009) *Development of LC-MS Methode for Determination of Glyphosate Residue in Wheat*. 32 Tartu, University of Tartu, Faculty of Science and Technology, Master's thesis: 5 - 7

da Silva, Aline Santana; Fernandes, Flávio Cesar Bedatty; Tognolli, João Olímpio; Pezza, Leonardo; Pezza, Helena Redigolo (2011) *A simple and green analytical method for determination of glyphosate in commercial formulations and water by diffuse reflectance spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 79:1881 – 1885

de Llasera, M. P. García ; Gómez-Almaraz, L.; Vera-Avila, L. E.; Peña-Alvarez, A. (2005) *Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluore detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit*. Journal of Chromatography A. 1093: 139 – 146

Hanke, Irene; Singer, Heinz; Hollender, Juliane (2008) *Ultratrace-level determination of glyphosate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 391: 2265 – 2276

Kawai, Satoshi; Uno, Bunji (1991) *Determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid chromatography after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride*. Journal of Chromatography. 540:411 - 415

Khrolenko, Maxim V.; Wiczorek, Piotr. P (2005) *Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride*. Journal of Chromatography A. 1093:111 – 117

Küsters, Markus; Gerhartz, Michael (2010) *Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphoric acid and glufosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin*. Journal of Separation Science. 33: 1139 – 1146

Lee, E. A.; Zimmerman, L. R.; Bhullar, B. S.; Thurman, E. M. (2002) *Linker-Assisted Immunoassay and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Analysis of Glyphosate*. Analytical Chemistry. 74:4937 – 4943

Miller, A.; Geravis, J. A.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. (2010) *Glyphosate Technical Fact Sheet*. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services

Morshed, Mahub; Ornar, Dzolkhifli; Mohamad, Rosli B.; Wahed, Samsuri B. Abd. (2011) *Determination of glyphosate through passive and active sampling methods in a treated field atmosphere*. African Journal of Agricultural Research. Vol. 6: Seite 4010 - 4018

Parrot, M. D. Françoise; Bedry, M.D. Régis ; Favarel-Garrigues, Ph. D. Jean-Claude (1995) *Glyphosate Herbicide Poisoning : Use of a Routine Aminoacid Appears to Be a Rapid Method for Determining Glyphosate and Its Metabolite in Biological Fluids*. Clinical Toxicology. 33:695 - 698

Qiang, Kun; Tang, Tao; Shi, Tianyu; Wang, Fang; Li, Jianqiang; Cao, Yongsong (2009) *Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride*. Analytica Chimica Acta. 635: 222 – 226

Roberts, Darren M.; Buckley, Nick A.; Mohamed, Fahim; Eddelston, Michael; Goldstein, Daniel A.; Mehrsheikh, Akbar; Bleeke, Marian S.; Dawson, Andrew H. (2010) *A prospective observational study of clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning*. Clinical Toxicology. 48:129 – 136

Rubio, Fernando; Veldhuis, Linda J.; Clegg, B. Stephen; Fleeker, James. R.; Hall, J. Christopher (2003) *Comparison of a Direct ELISA and HPLC Method for Glyphosate Determinations in Water*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51:691 – 696

Stalikas, Constantine D.; Konidari, Constantina N. (2001) *Analytical methods to determine phosphoric and amino acid group-containing pesticides*. Journal of Chromatography A. 907:1 – 19

Sun, Yujie; Wang, Chengyin; Wen, Qunying; Wang, Guoxiu; Wang, Honghai; Qu, Qishu; Hu, Xiaoya (2010) *Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphoric Acid in Water by LC Using a New Labeling Reagent, 4-Methoxybenzenesulfonyl Fluoride*. Chromatographia. 72:679 – 686

Székács, András; Darvas, Béla (2012). *Forty Years with Glyphosate, Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*, Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen (Ed.), ISBN: 978-953-307-803-8, InTech

URL-1 (29.09.2012) Goscinnny, S.; Hanot, V.: *Glyphosate in all its forms*. URL: http://www.favv.be/laboratories/labinfo/_documents/2012-01_labinfo7en-p12_en.pdf

URL-2 (29.09.2012) Zavitsanos, Paul; Meng, Chin-Kai : *Analysis of Glyphosate and Aminomethyl Phosphonic Acid by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry*. URL: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-4981EN.pdf>

URL-3 (04.10.2012) Ho, Dr. Mea-Wan; Cummins, Prof. Joe : *Glyphosat ist giftig – Roundup noch schlimmer* . URL: http://www.publiceyeconscience.ch/images/die_roundup_luege.pdf

URL-4 (04.10.2012) Bauchli-Theotikis, J : *Bestimmung von Glyphosat und AMPA auf Bahnanlagen* . URL: <http://www.bafu.admin.ch/publikationen/publikation/00261/index.html?lang=de>

URL-5 (04.10.2012) Hauser, Dr. B. : *Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Bestimmung von Glyphosat und Ampa in Boden* . URL: http://www.vdlufa.de/joomla/Dokumente/Fachgruppen/FG8/InternerBereichStartseite/Dokumente/AK%20Organik/FGVIII_AKO_2011_HT_Speyer_PR_Glyphosat_Hauser.pdf

URL-6 (04.10.2012) Gardner, Sue : *Glyphosat*. URL: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Glyphosate_Dissociation_V.1.svg&filetimestamp=20110708135952

URL-7 (04.10.2010) Molitor, Harald: *Selektive Anreicherung der Totalherbizide Glyphosat, Glufosinat und AMPA aus Wasserproben*. URL: http://www.lw-online.de/fileadmin/downloads/aktu_fachbeitraege/LWF2008_Molitor.pdf

URL-8 (04.10.2012) Reupert, R.; Schlett, C.: *Determination of Glyphosate and Aminomethyl Phosphonic Acid (AMPA) in Water by HPLC, Pre Column Derivatisation and Fluorescence Detection*. URL: <http://www.mn-net.com/DesktopModules/TabID/8543/default.aspx>

URL-9 (05.10.2012) Deutscher Bundestag: *Risikobewertung und Zulassung des Herbizid-Wirkstoffs Glyphosat*. URL: <http://dipbt.bundestag.de/dip21/btd/17/071/1707168.pdf>

URL-10 (04.10.2012) Rösler, Philipp: *Erste Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung vom 3. Mai 2011*. URL: http://www.dvgw.de/fileadmin/dvgw/wasser/recht/trinkwv1aendv_volltext.pdf

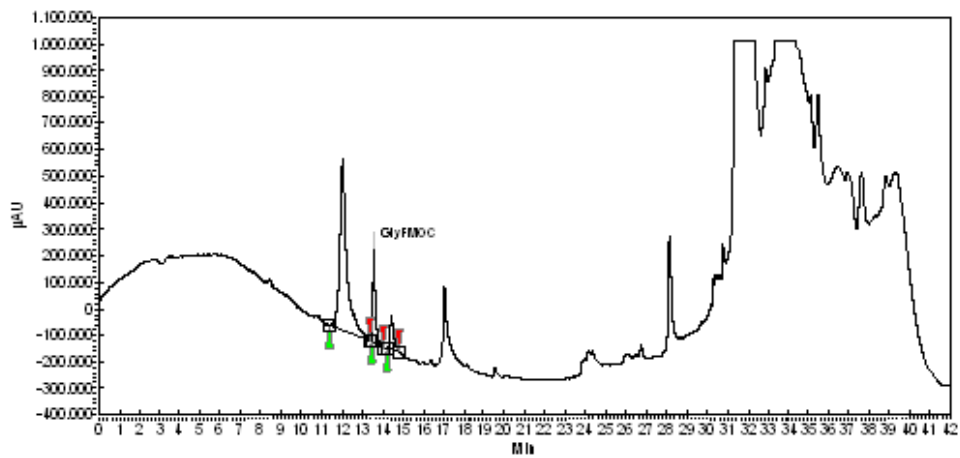
URL-11 (04.10.2012) LCTech GmbH: *Applicationsnote Glyphosate / AMPA*. URL: <http://www.lctech.de/Nachsaeuenderivatisierung.html>

URL-12 (04.10.2012) Kromidas, Dr. Stavros: *Methodenvalidierung in der Analytik*. URL: https://www.novia.de/fileadmin/novia/Downloads/docs/Methodenvalidierung_in_der_Analytik.pdf

URL-13 (04.10.2012) PolyIntell: *Molecularly Imprinted Polymers*. URL: <http://www.polyintell.com/technology/molecularly-imprinted-polymers/>

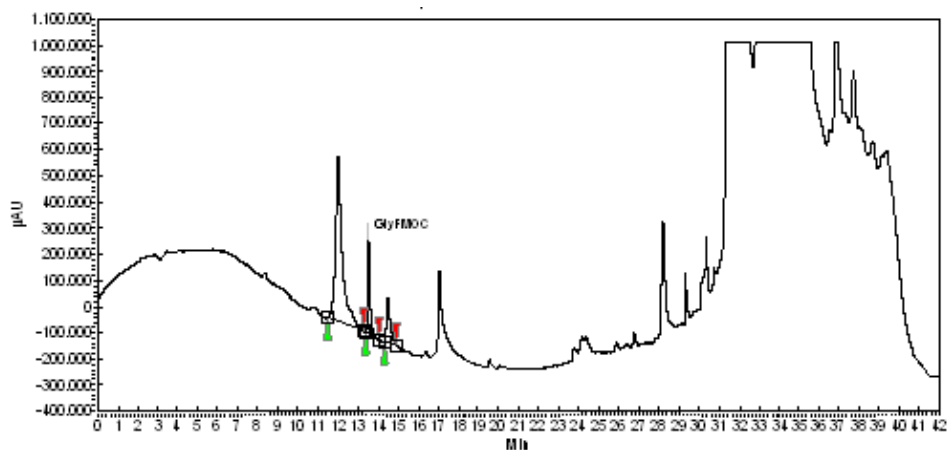
Yoshioka, Naoki; Asano, Migiwa; Kuse, Azumi; Mitsuhashi, Takao; Nagasaki, Yasushi; Ueno, Yasuhiro (2011) *Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A. 1218:3675 – 3680

Zelenkova, N. F.; Vinokurova, N. G. (2008) *Determination of Glyphosate and Its Biodegradation Products by Chromatographic Methods*. Journal of Analytical Chemistry. 63:871 – 874

Anhang

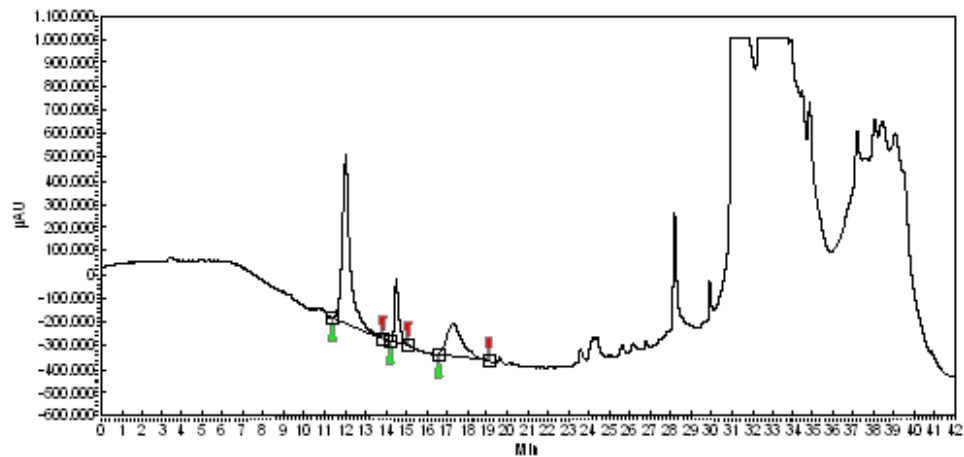
Index	Name	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	UNKNOWN	12,02	0,00	643261,5	255370,0	77,492
2	GlyFMOC	13,55	0,00	349319,5	47976,5	14,559
3	UNKNOWN	14,41	0,00	127026,8	26195,8	7,949
Total			0,00	1119607,9	329542,3	100,000

Abbildung 47: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule



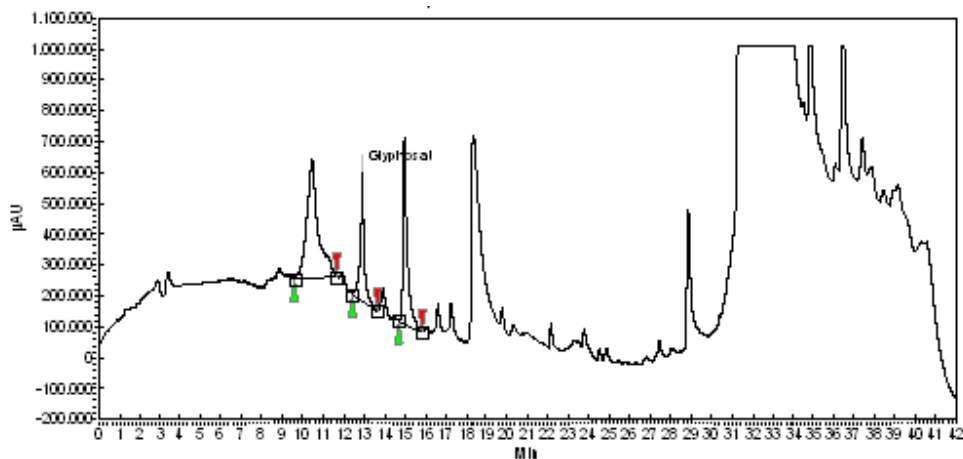
Index	Name	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	UNKNOWN	12,00	0,00	632293,1	242393,2	74,134
2	GlyFMOC	13,50	0,00	363180,5	48894,7	14,954
3	UNKNOWN	14,46	0,00	168111,5	35680,6	10,913
Total			0,00	1163585,1	326968,5	100,000

Abbildung 48: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule



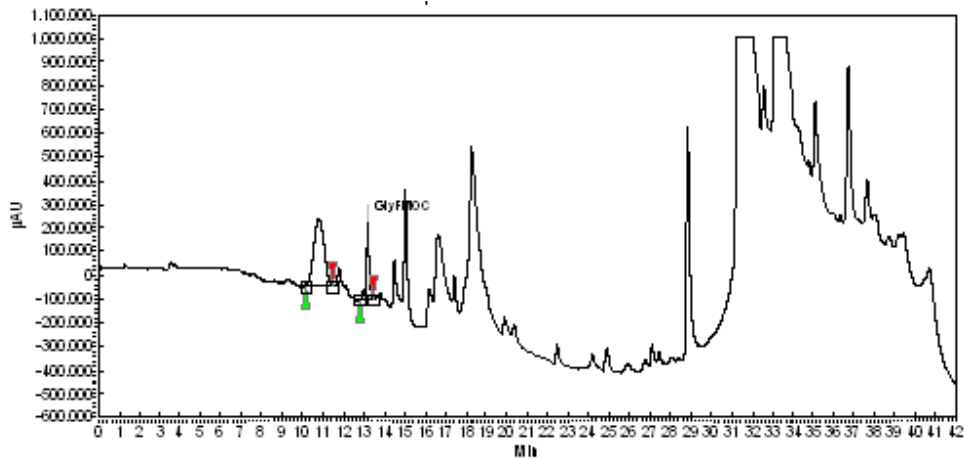
Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[μ V]	[μ V.Min]	[%]
1	UNKNOWN	11,37	12,03	0,00	716807,9	322552,1	63,277
2	UNKNOWN	14,23	14,50	0,00	270831,3	65526,4	12,855
3	UNKNOWN	16,58	17,26	0,00	136857,3	121664,9	23,868
Total				0,00	1124496,5	509743,5	100,000

Abbildung 49: Injektion von Wasser (HPLC-grade); Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 μ m Trennsäule



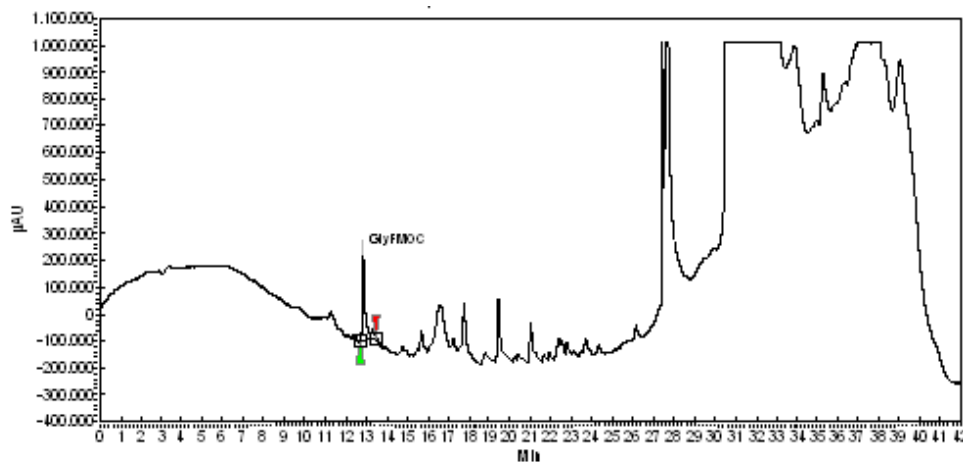
Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[μ V]	[μ V.Min]	[%]
1	UNKNOWN	9,61	10,46	0,00	383096,4	243449,7	52,122
2	Glyphosat	12,40	12,89	0,00	416507,7	85223,8	18,246
3	UNKNOWN	14,71	14,94	0,00	598680,9	138405,7	29,632
Total				0,00	1398285,0	467079,2	100,000

Abbildung 50: Injektion von 1 μ g/l GlyFMOc; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 μ m Trennsäule



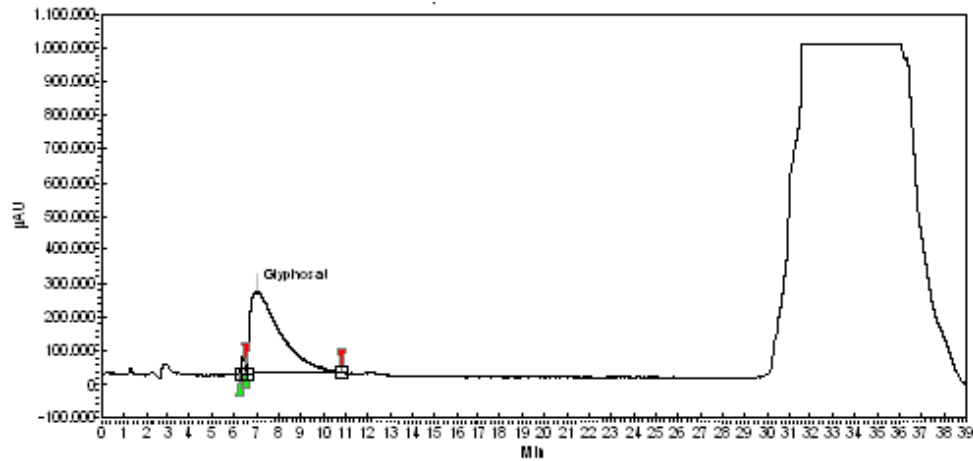
Index	Name	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	UNKNOWN	10,78	0,00	287976,6	160873,6	76,683
2	GlyFMOC	13,17	0,00	326967,4	48917,3	23,317
Total			0,00	614944,0	209790,8	100,000

Abbildung 51: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule (neue Vorsäule eingebaut)



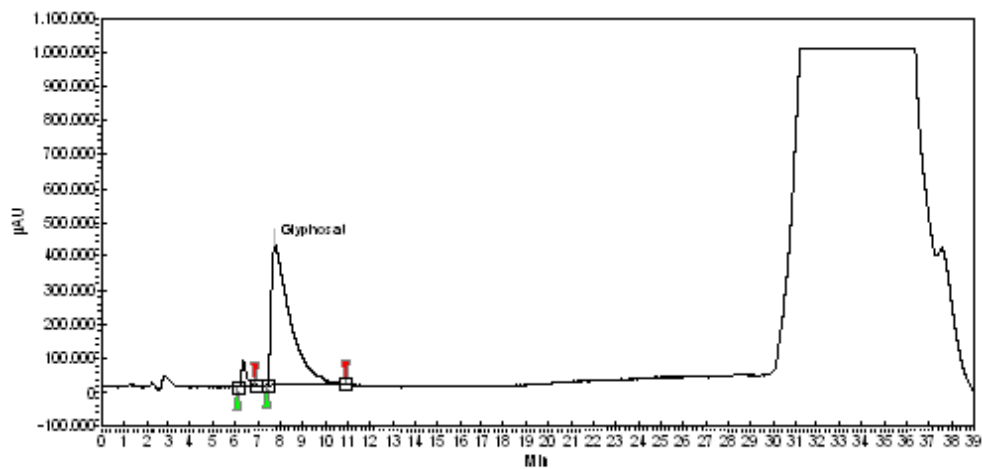
Index	Name	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	GlyFMOC	12,83	0,00	310222,0	56288,1	100,000
Total			0,00	310222,0	56288,1	100,000

Abbildung 52: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 1 (7 – 75 % ACN im Gradienten, KH₂PO₄-Puffer neu hergestellt, 30 °C Säulentemperatur); 5 µm Trennsäule



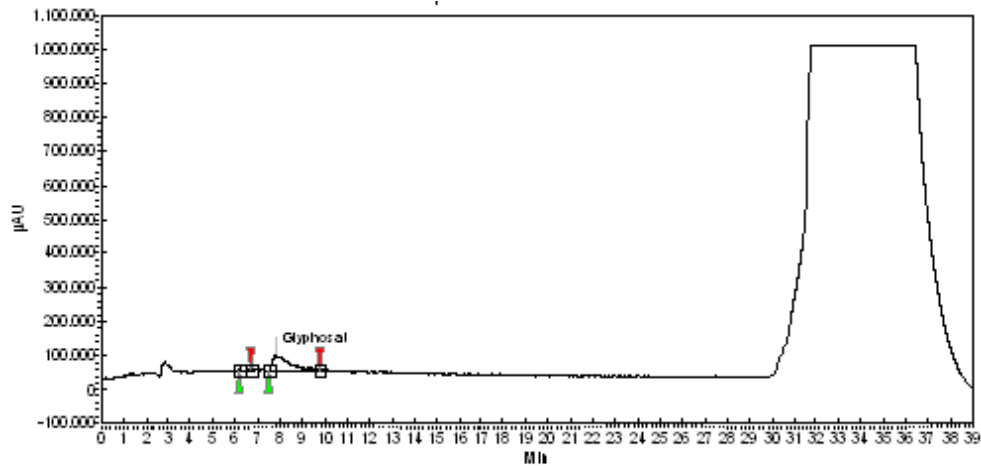
Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	UNKNOWN	6.23	6.40	0.00	51317.8	8964.1	2.322
2	Glyphosat	6.54	7.03	0.00	241362.4	377131.0	97.678
Total				0.00	292680.3	386095.1	100.000

Abbildung 53: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



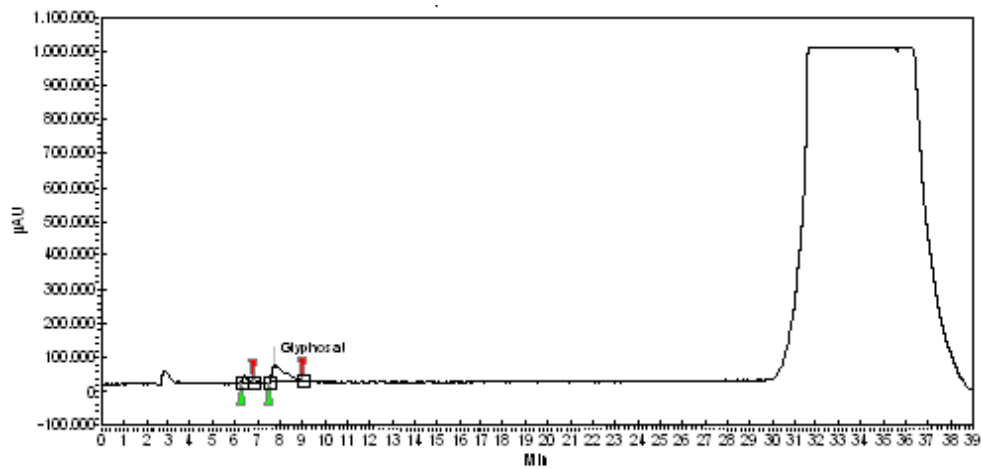
Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	UNKNOWN	6.07	6.35	0.00	77691.0	18875.1	4.477
2	Glyphosat	7.40	7.77	0.00	410775.5	402729.4	95.523
Total				0.00	488466.5	421604.5	100.000

Abbildung 54: Injektion von 10 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



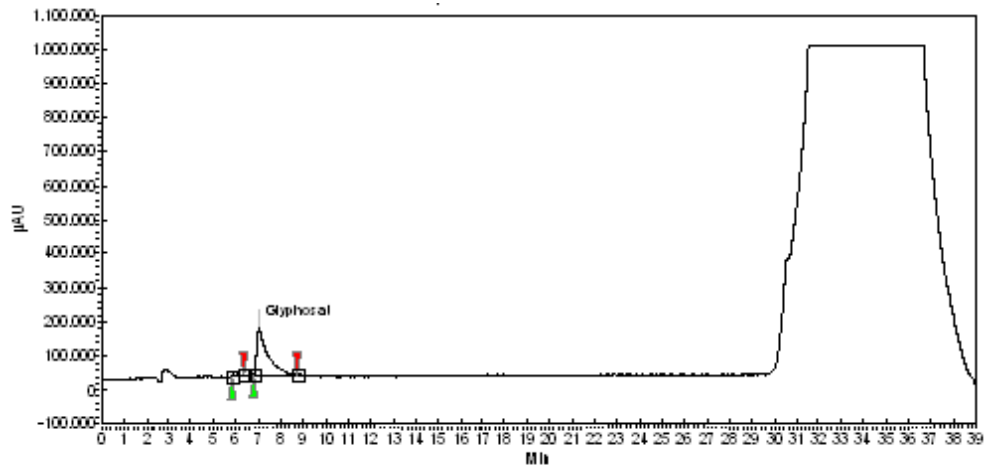
Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	UNKNOWN	6.15	6.30	0.00	19314.8	4466.3	10.053
2	Glyphosat	7.49	7.84	0.00	42796.7	39960.9	89.947
Total				0.00	62111.5	44427.2	100.000

Abbildung 55: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



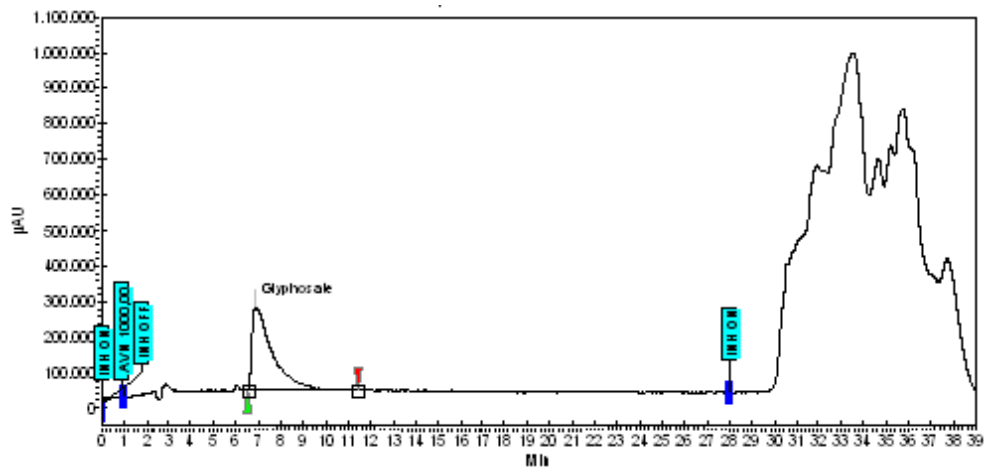
Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	UNKNOWN	6.22	6.41	0.00	22420.0	5160.5	13.448
2	Glyphosat	7.52	7.77	0.00	51798.7	33212.1	86.552
Total				0.00	74218.8	38372.6	100.000

Abbildung 56: Injektion von 1 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



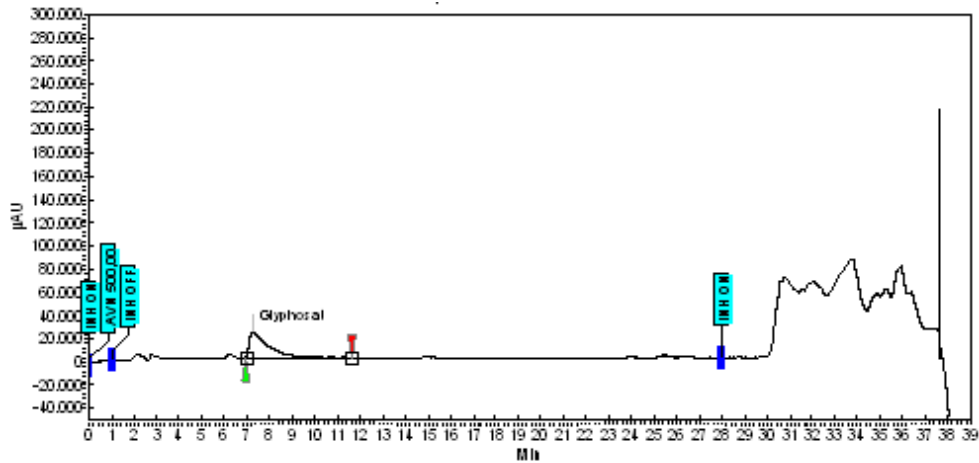
Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area [%]
1	UNKNOWN	5.84	6.00	0.00	16605.6	3324.4	4.137
2	Glyphosat	6.77	7.04	0.00	137551.4	77025.8	95.863
Total				0.00	154157.0	80350.2	100.000

Abbildung 57: Injektion von 2 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



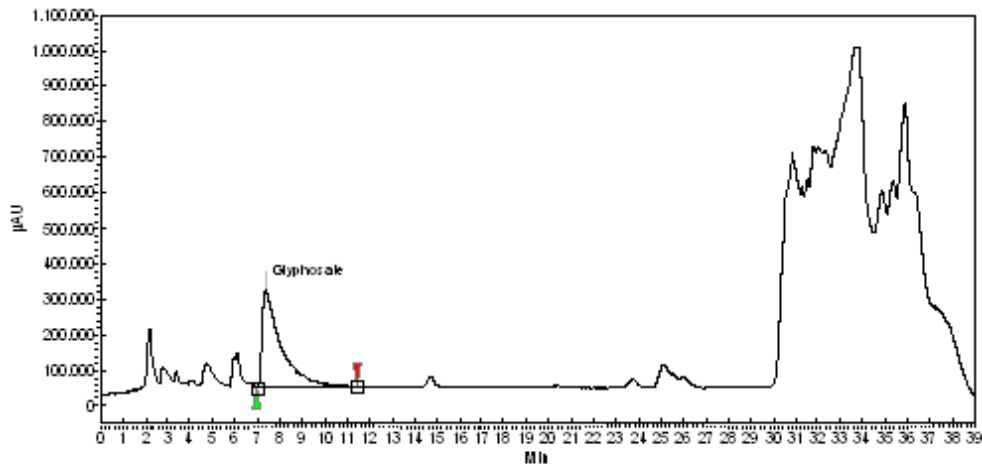
Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [μV]	Area [μV.Min]	Area [%]
1	Glyphosate	6.52	6.87	0.00	233141.9	251935.3	100.000
Total				0.00	233141.9	251935.3	100.000

Abbildung 58: Injektion von 5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



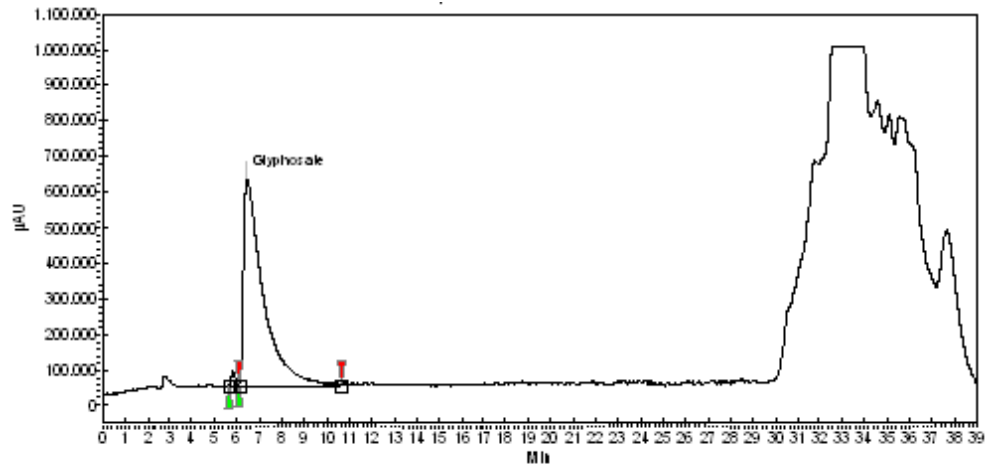
Index	Name	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	Glyphosat	7.29	0.00	22304.9	23105.5	100.000
Total			0.00	22304.9	23105.5	100.000

Abbildung 59: Injektion von 5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min, Signalverstärkung um Faktor 10 verringert); 5 µm Trennsäule



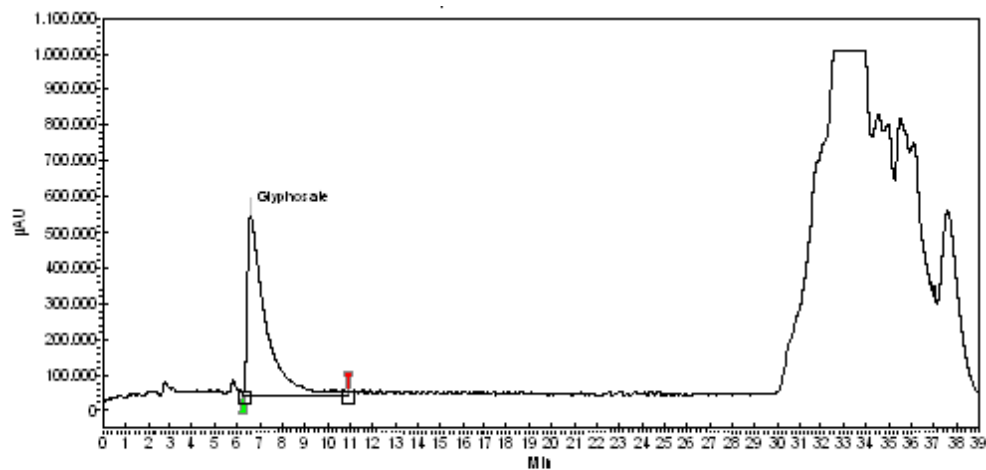
Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	Glyphosate	7.00	7.37	0.00	273039.5	264432.6	100.000
Total				0.00	273039.5	264432.6	100.000

Abbildung 60: Injektion von 5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



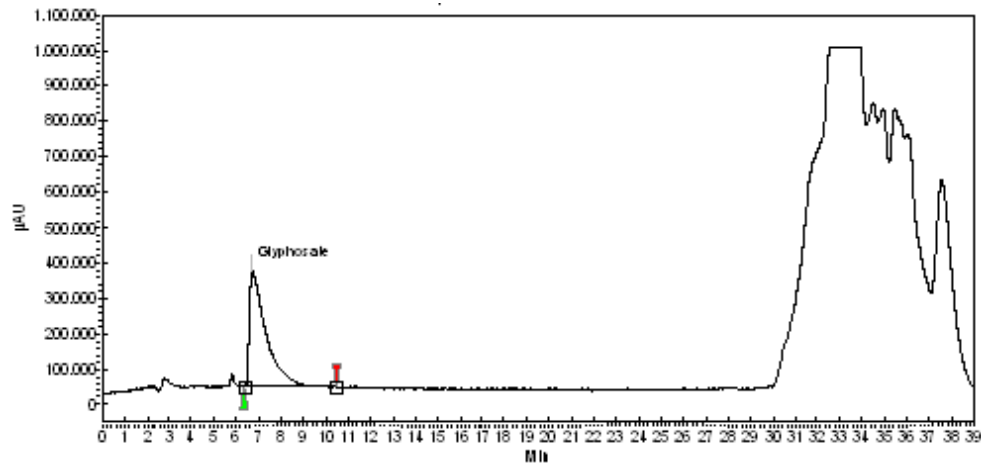
Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	UNKNOWN	5,65	5,83	0,00	41407,0	8511,1	1,451
2	Glyphosate	6,10	6,46	0,00	579344,0	578124,7	98,549
Total				0,00	620751,1	586635,8	100,000

Abbildung 61: Injektion von 12 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



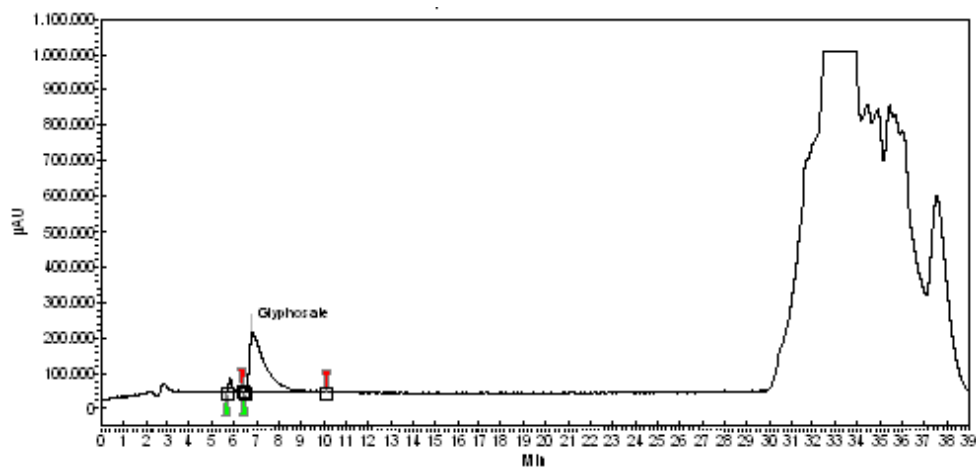
Index	Name	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	Glyphosate	6,59	9,00	509567,6	484109,1	100,000
Total			9,00	509567,6	484109,1	100,000

Abbildung 62: Injektion von 9 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



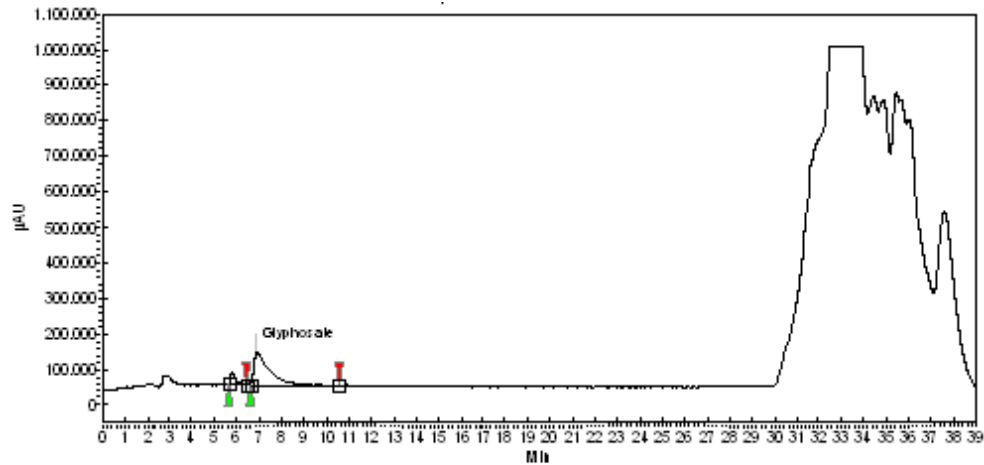
Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	Glyphosate	6.36	6.72	0.00	329618.2	285618.1	100.000
Total				0.00	329618.2	285618.1	100.000

Abbildung 63: Injektion von 6 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



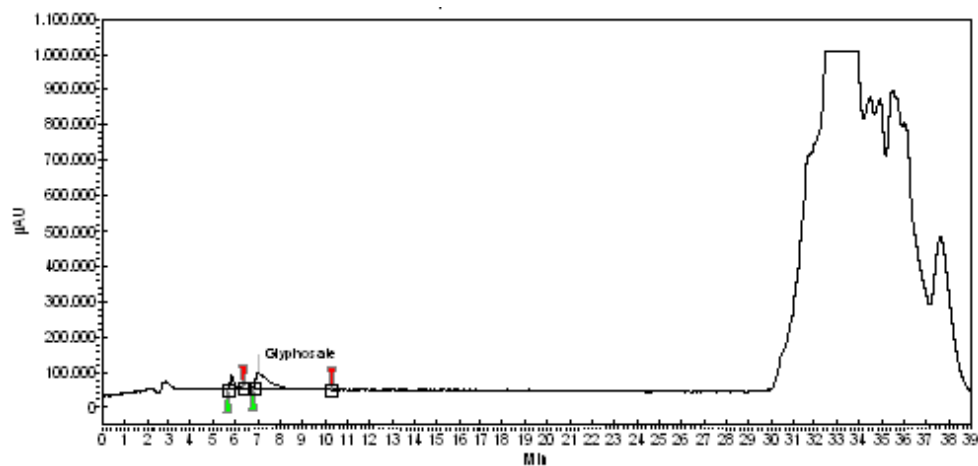
Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	UNKNOWN	5.64	5.81	0.00	42471.6	9330.0	6.090
2	Glyphosate	6.43	6.81	2.67	169483.7	143880.4	93.910
Total				2.67	211955.3	153210.4	100.000

Abbildung 64: Injektion von 3 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



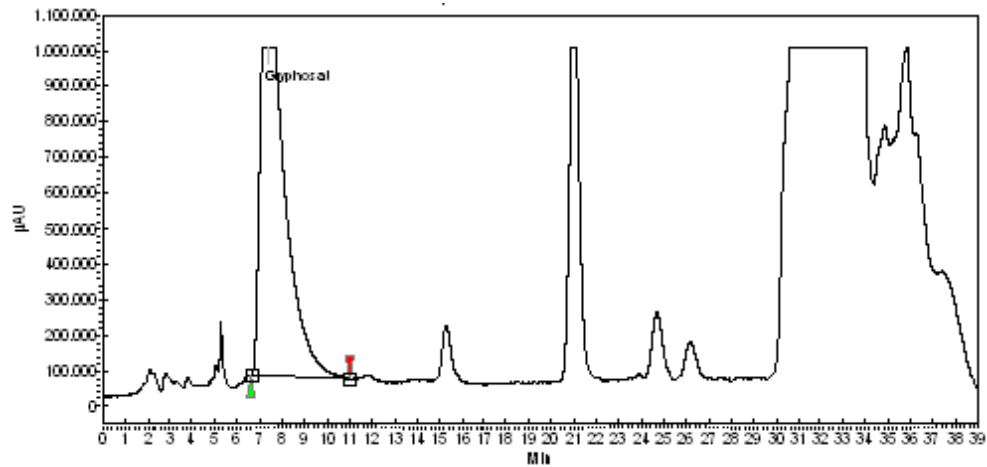
Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	UNKNOWN	5.66	5.82	0.00	37486.6	8645.8	10.042
2	Glyphosate	6.63	6.90	1.44	91548.3	77453.6	89.958
Total				1.44	129034.9	86099.3	100.000

Abbildung 65: Injektion von 1,5 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



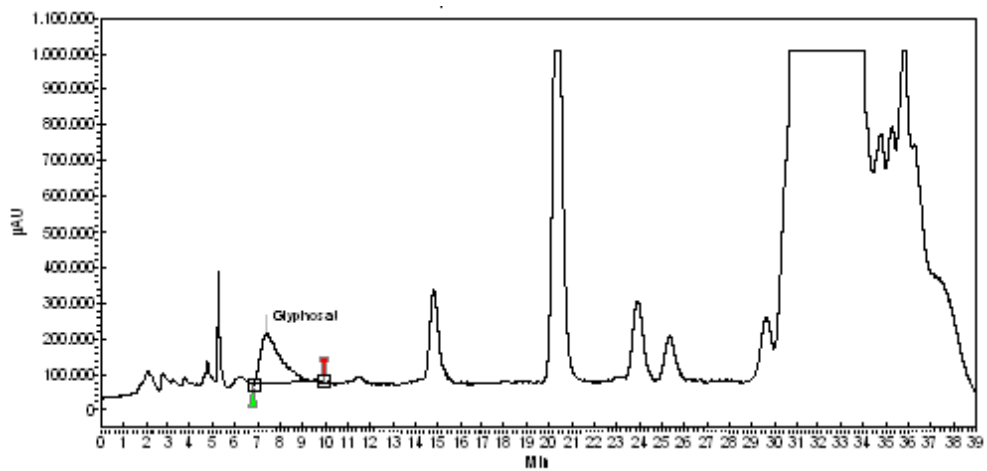
Index	Name	Start [Min]	Time [Min]	Quantity [ppb]	Height [µV]	Area [µV.Min]	Area [%]
1	UNKNOWN	5.65	5.83	0.00	39689.2	8613.4	20.369
2	Glyphosate	6.77	7.01	0.63	44791.8	33674.3	79.631
Total				0.63	84481.0	42287.7	100.000

Abbildung 66: Injektion von 0,75 µg/l GlyFMOC; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	Glyphosat	6,56	7,36	0,00	928967,1	1316205,7	100,000
Total				0,00	928967,1	1316205,7	100,000

Abbildung 67: Injektion von 12 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule



Index	Name	Start	Time	Quantity	Height	Area	Area
		[Min]	[Min]	[ppb]	[µV]	[µV.Min]	[%]
1	Glyphosat	6,81	7,43	0,00	140317,1	147150,5	100,000
Total				0,00	140317,1	147150,5	100,000

Abbildung 68: Injektion von 9 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

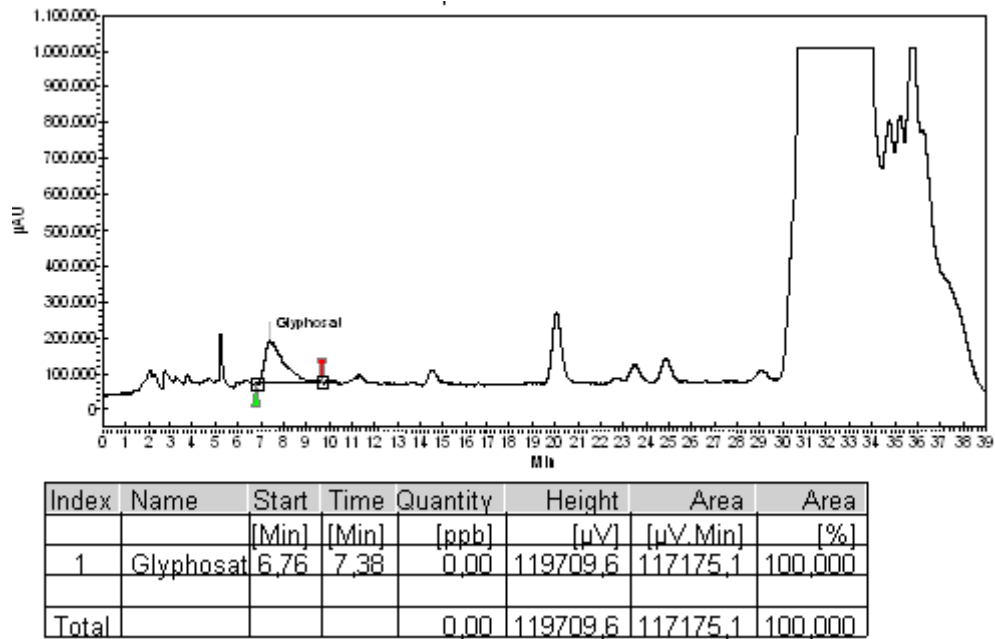


Abbildung 69: Injektion von 6 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

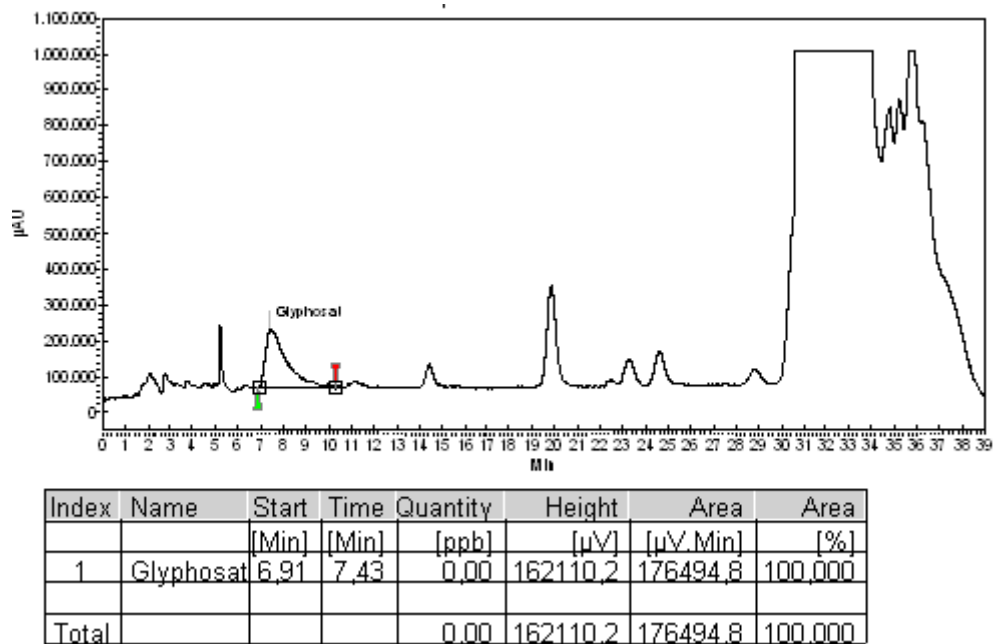


Abbildung 70: Injektion von 3 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

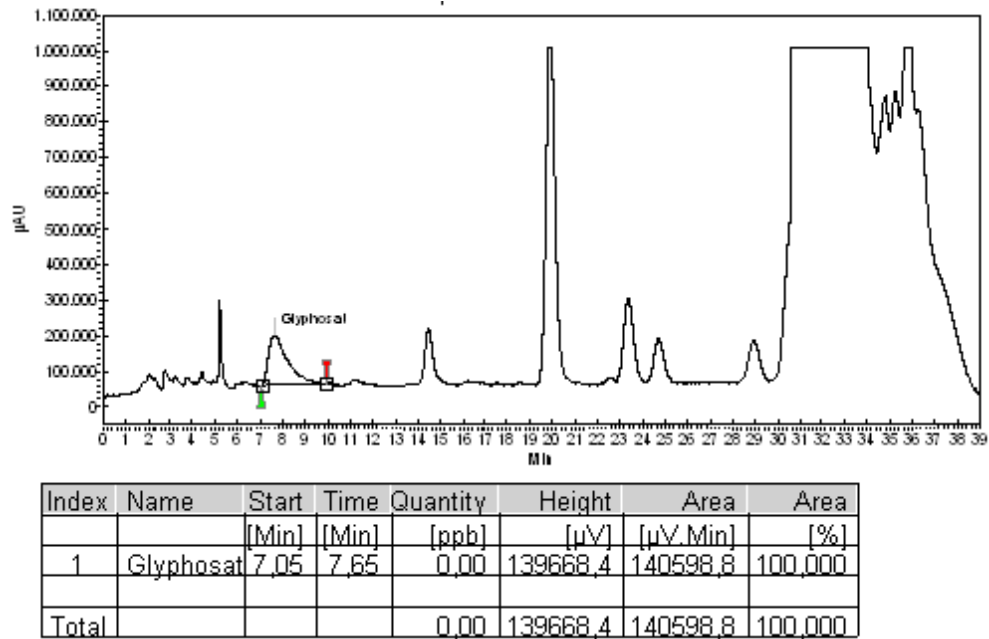


Abbildung 71: Injektion von 1,5 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

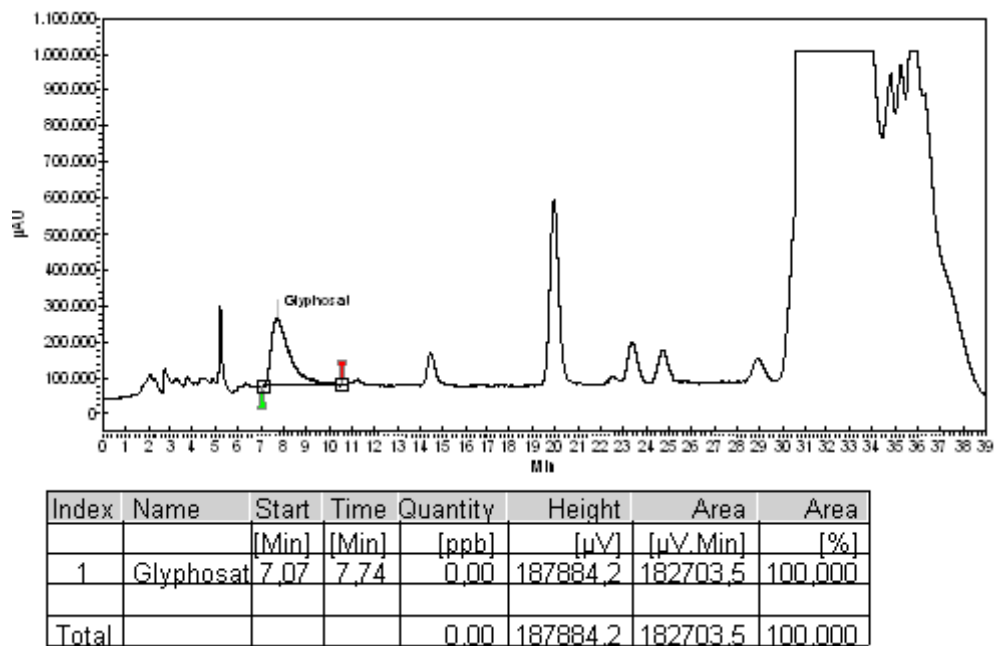


Abbildung 72: Injektion von 0,75 µg/l Glyderiv; Anlage B; Methode 3 (Fluss 0,5 ml/min); 5 µm Trennsäule

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 08.10.2012

Katja Herold